

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
Departamento de Cirugía



**TESIS DOCTORAL**

# **Modificaciones de la vesícula biliar en relación con la litogénesis**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Rosa Carmen Fernández Lobato**

**Madrid, 2015**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Cirugía

TP  
1988  
068



\* 5 3 0 9 8 7 4 2 6 9 \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x - 53 - 117632 - 7

## **MODIFICACIONES DE LA VESICULA BILIAR EN RELACION CON LA LITOGENESIS**



BIBLIOTECA

Rosa Carmen Fernández Lobato

Madrid, 1988

**Colección Tesis Doctorales. N.º 68/88**

**© Rosa Carmen Fernández Lobato**

**Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 2 - 28015 Madrid  
Madrid, 1988  
Ricoh 3700  
Depósito Legal: M-3796-1988**

AUTORA: ROSA CARMEN FERNANDEZ LOBATO

TITULO: MODIFICACIONES DE LA VESICULA BILIAR  
EN RELACION CON LA LITOGENESIS.

DIRECTOR: JOSE LUIS BALIBREA CANTERO

CATEDRATICO DE PATOLOGIA QUIRURGICA.  
FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE DE MADRID.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.  
SECCION O DEPARTAMENTO: CIRUGIA.  
FACULTAD DE MEDICINA.  
AÑO: 1986.



- IV -

A mis padres y a mi marido por el continuo ánimo  
que me han infundido; a mi hijo que no pudo vivir, por  
la esperanza que supuso.



INDICE.



AGRADECIMIENTO .....	XI - XII
ABREVIATURAS .....	XIII - XIV
INTRODUCCION .....	1 - 3
I.- Recuerdo anatomofuncional de la vesícula biliar .....	4
1. Estudio macroscópico .....	5
2. Estudio microscópico .....	5
2.1. Estructura microscópica de la vesícula biliar normal .....	6 - 13
2.2. Estructura microscópica de la vesícula biliar patológica .....	14 - 22
3. Aspectos funcionales de la vesícula biliar .....	22
3.1. Absorción - Concentración .....	22 - 27
3.2. Secreción .....	27 - 33
3.3. Regulación de función .....	33 - 35
II.- Estudio de la bilis .....	36
1. Bilis normal .....	37
1.1. Composición química .....	37 - 41
1.2. Formación de micelas .....	41 - 48
1.3. Ciclo enterohepático .....	48 - 52
2. Bilis litogénica .....	53 -
2.1. La bilis en la litiasis de colesterol .....	53 - 57
2.2. La bilis en la litiasis pigmentaria .....	58 - 60
III.- Litiasis vesicular .....	61
1. Recuerdo histórico .....	62 - 68

2. Factores generales influyentes .....	69 - 78
3. Estructura del cálculo .....	78 - 82
4. Composición del cálculo .....	82
4.1. Métodos de estudio .....	82 - 89
4.2. Factores modificadores .....	89 - 92
5. Tipos de cálculos .....	92
5.1. Clasificación por inspección visual .....	92 - 96
5.2. Clasificación por composición química .....	96 - 98
IV.- Mucosustancias .....	99
1. Composición química .....	100
1.1. Mucopolisacáridos .....	101-103
1.2. Glucoproteínas .....	104-106
2. Secreción y regulación .....	106-108
3. Localización de las mucoproteínas .....	108
3.1. Vesícula biliar .....	108-113
3.2. Bilis .....	113-117
3.3. Cálculos biliares .....	117-120
V.- Litogénesis .....	121
1. Mecanismo de formación de los cálculos de coles- terol .....	122
1.1. Alteración de la composición de la bilis .....	122-128
1.2. Inflamación .....	128-129
1.3. Estasis .....	129-130
2. Mecanismo de formación de los cálculos pigmenta- rios .....	131
2.1. Aumento de la concentración de bilirrubina ...	131

2.2. Infección .....	131-134
2.3. Estasis .....	134-136
HIPOTESIS .....	137-139
MATERIAL Y METODOS .....	140
I.- Material .....	141
1. Toma de muestras .....	142
1.1. Vesícula biliar .....	142
1.2. Cálculos .....	142-143
2. Sujetos .....	143-147
II.- Métodos .....	148
1. Métodos de estudio de la vesícula biliar .....	149
1.1. Técnicas histológicas .....	149-153
1.2. Controles .....	153
1.3. Valoración de resultados .....	153-157
2. Estudio de los cálculos .....	158
2.1. Análisis macroscópico .....	158
2.2. Estudio directo tras fragmentación .....	158-159
2.3. Análisis microscópico .....	159-161
3. Análisis estadístico .....	162
RESULTADOS .....	163
I.- Estudio histoquímico de la vesícula biliar .....	164
1. Análisis de los cambios histológicos .....	165-180
2. Análisis de las mucoproteínas .....	181-233
II.- Estudio cristalográfico de los cálculos .....	234

1. Análisis macroscópico .....	235-247
2. Estudio directo por fragmentación .....	248-251
3. Análisis microscópico .....	252
3.1. Cuantitativo .....	252-262
3.2. Cualitativo .....	262-284
III.- Relación entre estudios de vesícula biliar y cálculos .....	285-289
DISCUSION .....	290-291
I.- Discusión de los métodos .....	292-294
1. Estudio de la vesícula biliar .....	295-296
2. Estudio de los cálculos .....	296-298
II.- Discusión de los resultados .....	299
1. Estudio histoquímico de la vesícula biliar .....	300-307
2. Estudio cristalográfico de los cálculos .....	308-315
3. Relación entre estudios de la vesícula biliar y cálculos .....	316-317
CONCLUSIONES .....	318-320
BIBLIOGRAFIA .....	321-356

- X -

"Alguien dijo hace mucho tiempo que para ser feliz en el trabajo propio hay que ser capaz de realizarlo, percibir la sensación de éxito al llevarlo a cabo y no trabajar en demasía."

LENNINGER, 1979.

AGRADECIMIENTO.

Desde que comencé mis estudios de Medicina tuve una gran inquietud hacia la Cirugía, que se ha podido incrementar gracias a la ayuda inestimable del Prof. J.L. Balibrea Cantero. Me ha enseñado a conocer mejor la patología quirúrgica, animándome a realizar la presente Tesis. A él todo mi respeto y mi agradecimiento por su interés en mi labor científica.

Al Dr. J. Villacorta por haber sido mi iniciador y maestro en la cirugía, le debo un sentimiento especial de cariño. El me hizo gustar de la patología biliar que posteriormente ha constituido el tema de este trabajo. Mi gratitud a su colaboración tanto en mi formación médica como quirúrgica.

Mi reconocimiento al Dr. L. Ortega del Departamento de Anatomía Patológica, quien ha colaborado estrecha y amigablemente conmigo en la realización de las técnicas y estudios histoquímicos. Le debo mi profundo agradecimiento por su ayuda y mi amistad con la que no le recompensaré por su infatigable esfuerzo.

Toda mi gratitud a Dña. Rosario García, del Departamento de Geología de la Universidad Autónoma de Madrid, por su paciencia y su trabajo en el análisis cristalográfico de los cálculos biliares.

Mi expreso reconocimiento también a las laborantas del departamento de Anatomía Patológica, Paquita y Pilar por su inestimable ayuda, que ha hecho posible gran parte del método histológico.

También deseo hacer constar mi amistad y gratitud al Dr. A. Torres que de modo paciente e incansable me ha ayudado en la elaboración práctica del trabajo. Le debo gran parte del empuje que ha conseguido la culminación de esta Tesis.

Finalmente, me gustaría agradecer a todos aquellos que de modo práctico o anímico, en grande o pequeña escala han colaborado y me han hecho finalizar esta obra. Sin su ayuda no hubiera podido conseguirlo.

#### ABREVIATURAS.



- XIV -

aa:	aminoácidos.
AA:	técnica histoquímica del AZul Alcían.
ALDA - FUC:	técnica histoquímica de Aldehído Fuchina.
AR:	visión arquitectural de la mucosa de la vesícula.
CCK - PZ:	colecistoquinina - pancrezimina.
CELU:	visión celular al microscopio.
CH:	cambios histológicos.
EP:	epitelio.
ER:	epitelio de revestimiento.
GL:	glándulas de la pared de la vesícula.
HE:	técnica histoquímica de Hematoxilina Eosina.
MAMS:	mucoproteínas ácidas muy sulfatadas.
MAPS	mucoproteínas ácidas poco sulfatas.
MN:	mucoproteínas neutras.
MP:	mucoproteínas o mucopolisacáridos.
PAS:	técnica histoquímica del Acido peryódico de Schiff.
Pm:	Peso molecular.
Pm:	polo mundial de la célula de la mucosa de la vesícula.
Pg:	prostaglandinas.
RE:	retículo endoplásmico.
RER:	retículo endoplásmico rugoso.
SRA:	senos de Rockitansky - Aschoff.
SL:	senos o conductos de Luschka.
TO:	visión total de la célula al microscopio.
x:	media estadística.
VB	vesícula biliar.
VEL:	vellosidad.

## INTRODUCCION.

Desde que 1000 años antes de J.C. se descubrieran unas momias con cálculos biliares en el Valle del Nilo, la litiasis vesicular se ha convertido en el siglo XX en una de las enfermedades más comunes, con una indicación quirúrgica más concisa en la actualidad.

Quizá por haberse llegado a un tratamiento y técnicas quirúrgicas apenas mejorable incluso en los resultados, pues se produce la curación total en el 90% de los casos (1), no se ha adentrado profundamente en su estudio con intención preventiva.

Sólo la bilis ha sido analizada por múltiples autores, en su composición y variaciones, en este tipo de enfermos con litiasis. Se han planteado incluso hipótesis que han iniciado el uso de terapéuticas médicas para que modificando la composición biliar, pudieran disolverse las concrecciones biliosas sin necesidad de ser extirpadas por métodos quirúrgicos.

El estudio de los distintos tipos de cálculos se ha realizado más con ánimo de conocimiento morfológico de los mismos, que con la idea de poder extraer conclusiones válidas para su prevención.

La vesícula ha sido siempre la gran ignorada en este tema. Sin embargo con la introducción de las técnicas de microscopía electrónica y de los métodos de inmunohistoquímica se han visualizado hallazgos en la pared de la vesícula que pueden hacer pensar en una aportación activa a la litogénesis. La producción de mucosustancias por su mucosa alterada podría ser el núcleo sobre el que se iría formando el cálculo, tras aposición de sustancias de la bilis.

Es interesante e innovadora la idea introducida recientemente por algunos investigadores, sobre la importancia que estas mucosustancias tienen en la fisiopatología de la litiasis, y que tanto la prevención de su formación como su mejor conocimiento podrían conducir a revelar la etiología base de esta enfermedad.

Por ello, y tras la revisión de numerosos estudios sobre el tema, se ha centrado nuestra atención en dos aspectos:

- 1.- La mucosa de la vesícula biliar en sus cambios histológicos y en las mucosustancias que produce por la inflamación.

2.- Los cálculos y su composición química, dándole importancia a su estructuración morfológica.

Para la valoración rigurosa y lo más exhaustiva posible de estos dos aspectos realizamos una revisión del tema que incluye:

- Estudio de la mucosa de la vesícula biliar.
- Estudio de la composición de la bilis.
- Estudio de la composición y morfología de los cálculos.
- Estudio de las mucosustancias encontradas tanto en vesícula, bilis como en los calculos.

El conocimiento en profundidad de estos temas, es importante para el mejor planteamiento del estudio que va a ser el motivo de la presente Tesis, teniendo como idea principal el profundizar en la fisiopatología de esta tan frecuente e importante enfermedad como es la litiasis biliar.

I.- RECUERDO ANATOMOFUNCIONAL DE LA VESICULA BILIAR.

#### 1.- ESTUDIO MACROSCOPICO DE LA VESICULA BILIAR.-

La vesícula biliar (VB) es un órgano hueco de aspecto piriforme adherido intimamente a la cara posteroinferior del hígado. Consta de un fondo ciego, un cuerpo, cuello y el conducto cístico que lo une a la vía biliar principal.

Su pared consta de 5 capas: una lámina mucosa, formada por una lámina propia y un epitelio superficial; una capa muscular de tipo liso; una capa de tejido conjuntivo perimuscular y una capa externa serosa. (2)

Interiormente la mucosa de la VB tiene pliegues que se subdividen en otros más pequeños o "CRIPTAS", distintos de los senos de Luschka (SL) y senos de Rockitansky-Aschoff que también contiene. (3)

Hulten (4) por cistoscopia ha observado numerosos orificios como nichos redondos y variables en número y tamaño dentro de la mucosa. En la zona del cuello y cerca del cístico forma hileras con profundidad de 1-2 mm. Los nichos están tapizados por el epitelio y aumentan enormemente la superficie. Se ha visto que se encargan de la absorción de agua y electrolitos y que secretan contenido PAS (+) demostrándose su origen glicoproteico pero no de glucógeno. (5,6)

#### 2.- ESTUDIO MICROSCOPICO DE LA VESICULA BILIAR.-

El análisis de la mucosa de la VB bajo el microscopio aporta gran cantidad de datos. Hemos de diferenciar sin embargo la conformación histológica de la VB normal y de la VB que ya ha sufrido modificaciones dado que en ésta se producen modificaciones por la inflamación y los cálculos que le dan unas características especialmente interesantes. El conocimiento de la estructura normal de la VB es base para reconocer los datos patológicos.

#### 1.1.- ESTRUCTURA MICROSCOPICA DE LA VB NORMAL.-

La VB del hombre y de algunos animales se consideran similares salvo en detalles por lo que muchos estudios realizados se extrapolan al ser humano.

Se examinara la composición histológica de cada una de las capas de la VB.

##### a) MUCOSA.-

El epitelio o mucosa contiene 4 tipos de células descritas por EVETT (7) y Fox (8) en un estudio al microscopio óptico del fundus de VB humanas.

Su patrón histológico es un epitelio columnar simple con células que se extienden desde la membrana basal hacia la luz en una sección perpendicular. En ocasiones existen varias capas celulares. (8)

Las más comunes son las células EPITELIALES, seguidas de las basales y de las denominadas CELULAS LAPIZ y las INTESTINALES que son las más raras. Otro tipo de células como las GLANDULARES no se presentan normalmente. (9)

La membrana basal sobre la que aparecen estas células es una línea de 300 Å de grosor y límites mal definidos. Cuando existen dos células epiteliales, la membrana basal pasa sin extenderse dentro del espacio intercelular habitual de 150-200 Å formando puentes tipo GAP, quedando unidas herméticamente a ese nivel. (2)

##### - CELULAS EPITELIALES.-

##### FORMA.-

Se denominan también células PRINCIPALES (10), en CEPILLO o EMI-GRANTES, siendo su forma hexagonal en la mayoría de los casos o cuboidea

con ángulos obtusos en otras. (8,11)

Su tamaño varía. El diámetro es de 97 milimicras. Las células que rodean la luz son más cortas, obtusas y esparcidas, midiendo 0.7 micras y 50 micras cuadradas. Las de las vellosidades son más largas, con 0.8 micras y 80 micras cuadradas.

Su membrana plasmática es continua con un borde libre con microvellosidades descritas por RALPH en 1950 (12). Estos MICROVILLIS generalmente son independientes pero a veces salen dos de una misma base. Son alargados y con una estriación longitudinal. A veces presentan dilatación terminal o CAPITULUM MICROVILLI y otros muestran una fina línea externa que rodea su apex o ARTERULAE MICROVILLI. (2,8,11,13) (FIGURA Nº 1)

#### CITOPLASMA.-

El interior de estas células es granuloso, con un núcleo redondo u ovoidea y posee un nucleolo. (8) El núcleo tiene un contorno con doble membrana que posee poros.

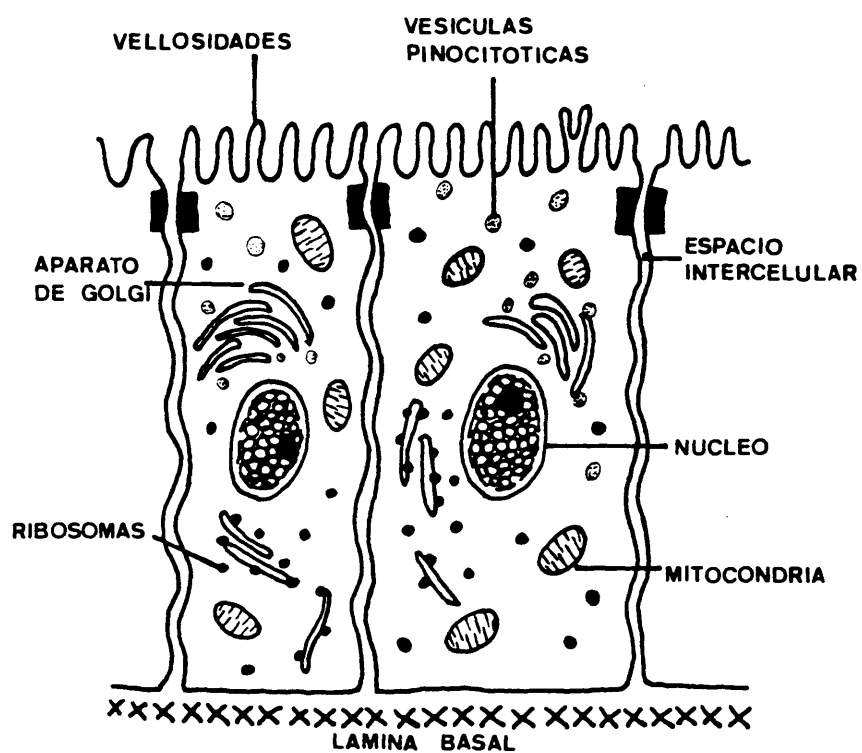
El citoplasma de las zonas apicales y las paredes laterales es más denso, con una condensación de fibrillas y material amorfo oscuro en el mismo. (13)

La superficie intervellosa muestra irregularidades de la membrana plasmática características de vesículas pinocitóticas. (8) En ocasiones aparecen invaginaciones de la membrana, formando estructuras vesiculares cuyo contenido se continúa con la luz a través de orificios de 0.02 micras de ancho con forma de estrechas hendiduras.

Las crestas son formaciones tanto funcionales como morfológicas en el conejo, pero desaparecen con la replección de la VB en los guinea-pig, ratón y hamster. En el pollo la situación es intermedia. Esta recurrencia se ha atribuido a los vasos endoteliales que dan una base fija. (14)

#### MICROSCOPIA ELECTRONICA.-





**FIGURA Nº 1.-** Células de la mucosa de la VB en condiciones normales, con sus diferentes organelas.

Tomado de POIRIER. (11)

Con el microscopio de alta resolución (7) se evidencian zonas distintas en la célula. Una zona cuticular compuesta de los microvillis (14) y que se encuentra subyacente a una banda de citoplasma llamada ZONA CLARA por la ausencia de mitocondrias y gránulos.

El resto del citoplasma se compone de un material fibrilar o TONO FIBRILAR que converge en una especie de cuerpo terminal extendiéndose hacia los microvillis. (7,15)

Debajo de la zona clara existe la denominada ZONA OSCURA con multitud de organelas (mitocondrias, vesículas, gránulos y retículo endoplásmico) que llega a la tercera parte de la altura de la célula.

Las paredes laterales se cubren de microvillis que juegan un papel importante en el mecanismo del transporte de fluidos y resorción. (10) Las paredes intercelulares se encuentran unidas por desmosomas y entre las células hay canales o espacios laterales. (14)

Las mitocondrias son como las de los otros tejidos colocándose en la zona oscura de la célula.

El aparato de Golgi se localiza en la zona supranuclear y subapical conteniendo vesículas, vacuolas y gránulos de gran tamaño. Portan un material de alta densidad y amorfo (8), considerado fruto de su secreción. Se considera muy importante por la posible acción sintetizadora de glicoproteínas que se engloba en esas diferentes estructuras:

- GRANULOS O VACUOLAS:

De gran tamaño (0.1-0.2 micras), densos, de forma irregular y con contenido granular no homogéneo y PAS positivo. (14) Los gránulos contienen un material glicogénico, que se forma a los 7 días en el cultivo del tejido de VB de guinea pig (16) localizándose en la zona apical de las células. (16) Se ha identificado el contenido como de mucosustancias ácidas. (16)

Dicha secreción sólo se ha visto en las células epiteliales, no pudiéndose comparar por ello con las células caliciformes por

no sufrir distensión celular.

Estas gotas se han observado ocasionalmente en trance de fusión con la membrana delimitante, sufriendo una exocitosis, aunque en pocas ocasiones se han captado su descarga a la luz. (8)

Los gránulos se ubican en la vecindad de la cara interior o cara secretora del Golgi.

- PEQUEÑOS GRANULOS:

De un tamaño de 0.03-0.05 micras o más pequeños. (200-800

A) Pueden ser escasos o incontables y se colocan brotando desde la membrana sacular.

- SACULOS O CISTERNAS:

Son estructuras alargadas de mayor tamaño (0.3-0.8 micras) que se colocan paralelamente en 3-5 pares con una distensión irregular, estando en la superficie cóncava del dictiosoma y con una densidad baja, con contenido homogéneo y granular. Se rodean de una membrana simple. (7,17)

Cuando se colocan los gránulos centralmente, debido a su densidad, semejan una forma de "ANILLO de SELLO". (7,18)

El retículo endoplásmico rugoso (RER) no es muy prominente y posee un número moderado de ribosomas.

La diferencia de la VB humana con la de las ratas o perros, es que en los primeros no se dan las células epiteliales cuerpos lipoideos, membrana celular indentada, dilatación de espacios intercelulares, cuerpos multivesiculares ni membrana con figuras mieloides. (7)

Entre las células de las glándulas de la región del cuello y de las glándulas de tipo antral hay diferencias. En estas últimas existen además dos tipos de células endocrinas o enterocromafines (19) y se dan en el 40% de las VB normales mientras que son más frecuentes en las calculosas.

- CELULAS BASALES.-  
=====

Son poco frecuentes, localizándose entre la membrana basal y las células epiteliales. Contorno liso, núcleo redondo y nucleolo prominente. (7)

Poseen un pequeño número de mitocondrias y ocasionalmente retículo endoplásmico (RE) visible y libre de otras organelas. Entre las paredes laterales de unas y otras existen espacios intercelulares dilatados a veces con un contenido floculante y moderadamente electrón-denso. (8)

Las zonas apicales y las paredes laterales son más densas por concentrarse en ellas material amorfo del citoplasma.

- CELULAS TIPO INTESTINAL.-  
=====

Son poco comunes y se denomina su existencia también METAPLASIA INTESTINAL. Su borde libre es rico en microvillis largos y con corazón fibrilar muy marcado. Entre las zonas intervallosas hay evidencia de pinocitosis.

Las paredes laterales se unen con cuerpos tipo BAR y poseen mitocondrias y numerosas vesículas en la zona apical, con ribosomas libres y RE abundante. También se han observado lisosomas y algunas gotas de contenido mucoso junto al Golgi en raras ocasiones.

El núcleo es redondo y su nucleolo prominente (8) es teñible con PAS. Se evidencian más nítidamente estas células cuando la VB está llena y no vacía. (14)

- CELULAS LAPIZ.-  
=====

Son también infrecuentes. reciben este nombre por su forma alargada y con ángulos agudos. No se ven en la superficie libre del epitelio pero sí entre las células epiteliales ordinarias.

Tienen un citoplasma electrón-denso y una membrana plasmática con villis y gran número de RE y mitocondrias. No parece que contengan moco pero debido a su alta densidad es difícil valorarlo.

El núcleo es más pequeño y denso que el de las células ordinarias y con un contorno dentado. (8) Se creen inactivas metabólicamente a pesar de que no se conoce su naturaleza pero se ha visto que poseen un alto contenido en enzimas. (18)

b) SUBMUCOSA.-

No se encuentra bien desarrollada existiendo en la lámina propia o corion glándulas tubuloalveolares simples, cuyo epitelio es cuboideo y claro. Sus núcleos son oscuros. (20)

Se compone de acúmulos laxos de fibras de colágeno y fibroblastos con una rica vascularización formada por capilares de endotelio fenestrado con poros de un diámetro que oscila entre 30 y 50 milimicras.

Posee numerosos elementos nerviosos no mielinizados mientras que en la mucosa no se ven terminaciones nerviosas. (7)

Dentro de su conformación existen a veces dos tipos de formaciones glandulares especiales:

- SENOS DE ROKITANSKY-ASCHOFF:

Descritos por Aschoff en 1909 observando además que la irritación crónica de la VB produce un aumento del número de glándulas mucosas. (4)

Son como ciertos divertículos que se forman a lo largo de la vida, que pueden ser únicos o numerosos y se forman de la mucosa, tapizándose por su epitelio cilíndrico, extendiéndose a través del corion y capa muscular.

Son quizá resultado de las alteraciones patológicas de la pared que permiten la evaginación de la mucosa a través de muelles compuestos por la pared muscular.

- CONDUCTOS DE LUSCHKA:

Se localizan cerca del cuello y recubren la capa conjuntiva perimuscular uniéndose a veces a conductos biliares. No se unen a la luz de la VB y quizá son conductos biliares aberrantes originados durante el desarrollo embrionario del árbol biliar, por lo que son considerados restos embrionarios.

c) CAPA MUSCULAR.-

Consta de fibras longitudinales, trasversas y oblicuas, con una red de fibras elásticas. Es más débil en el hombre que en los animales. (21) El espacio entre haces musculares se ocupa con fibras colágenas, reticulares y elásticas con algunos fibroblastos. De ella depende la contractibilidad de la VB. (22)

Por fuera de la capa muscular existe un tejido conjuntivo denso que rodea completamente la VB y que contiene fibroblastos, macrófagos, células linfoides, lóbulos de grasa, fibras colágenas, elásticas y vasos sanguíneos, linfáticos y los nervios del órgano.

d) CAPA SEROSA.-

Es una capa que recubre el órgano y lo une al peritoneo del hígado, viéndose a su través tanto los vasos como los linfáticos ramificados.

A partir del cuello se continúa con el conducto cístico cuya pared presenta pliegues que forman la VALVULA ESPIRAL DE HEISTER, dudándose de su contenido en haces musculares lisos. (2)

1.2.- ESTRUCTURA MICROSCOPICA DE LA VB PATOLOGICA.-

Con el tiempo se produce un aplanamiento de la mucosa que puede considerarse fisiológico. Ocurre en un tercio de los casos acompañado de la desaparición de vellosidades; cuando los pacientes tienen más de 40 años en las dos terceras partes de los casos.

Así mismo los senos de Rokitansky-Aschoff (R-A) son ausentes en el 14%. Del mismo modo en la inflamación de la VB se produce atrofia de la mucosa con aplanamiento del epitelio columnar. Se han encontrado células inflamatorias mononucleares (linfocitos y células plasmáticas) y en la capa muscular, tejido conectivo y lámina propia se observa una fibrosis aumentada. (19)

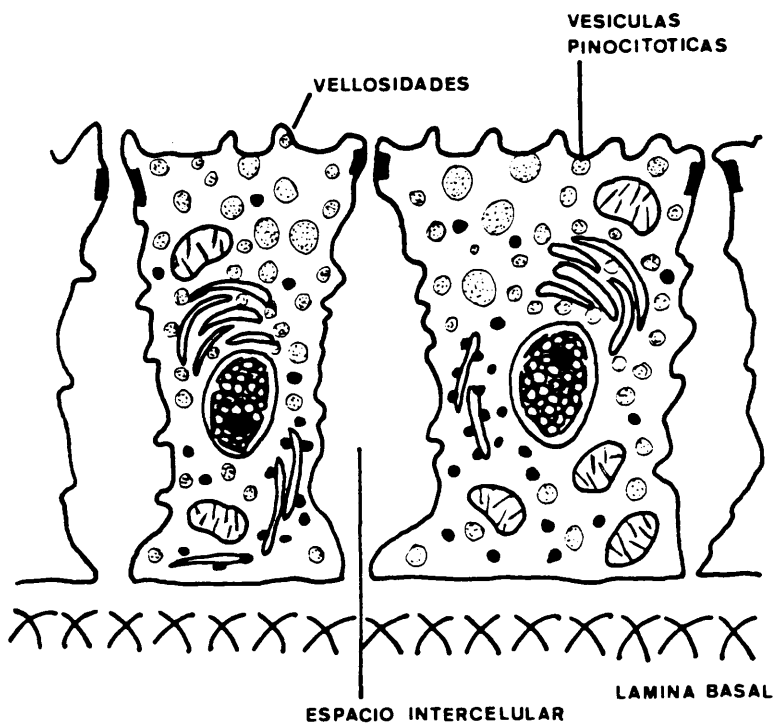
Se ha observado metaplasia intestinal sobretodo en la región del fundus que se produce por la edad. (19,23) Se forman además glándulas mucosas en algunas ocasiones, dependiendo del grado de la metaplasia y de la inflamación. (24) En casos excepcionales se ha observado mucosa gástrica heterotópica.

En el 40% se observaron macrófagos con colesterol en las zonas de las vellosidades y en su parte superficial.(11) (FIGURA Nº 2)

En los conejos se ha demostrado que en la colelitiasis se produce un daño celular en el epitelio. (25) Se ha sugerido que sufren deshidratación las células epiteliales.

La VB sufre una distensión denominada WORM LIKE o MULBERRY-LIKE o vesícula fresa, (26,27) que puede ser el resultado de interdigitaciones villiformes observadas entre las superficies celulares debidas a GAP, dando esa plicación con imagen de fresa de la mucosa.

Se observan también ulceraciones mínimas en lamucosa que se recubren de un material amorfo mucoso y algunas células herméticas, (27). Las células epiteliales al margen de estas ulceraciones se encuentran hinchadas e independientes de las células con inicios de degeneración y que puede llegar a los conductos de Luschka (S-L) (28,29). Conforme se incrementa la severidad



**FIGURA Nº 2.-** Células de lamucosa de la VB con alteraciones por la colecistitis crónica, destacando el aumento de las vesículas con contenido mucoproteico y de los espacios intercelulares.  
Tomado de POIRIER. (11)



de la enfermedad, las células se hacen más cuboides y hay más descamación. Estas ulceraciones provocan fibrosis o cicatrices cerrando la salida de la bilis y produciendo estasis y cierre del círculo vicioso. (30)

En los estadios tardíos en los que se ha dañado la mucosa como en las colecistitis agudas el epitelio se cubre con leucocitos, eritrocitos, bacterias, fibrina y restos celulares, con congestión y grandes áreas de descamación. Es esta infiltración celular de la pared junto a la hipertrofia e hiperplasia lo que aumenta el grosor de la VB y puede ser visualizada y diagnosticada por ultrasonidos. (31)

La VB responde precozmente al ataque nocivo similarmente al resto de las membranas mucosas; así en obstrucciones neoplásicas del conducto biliar (32), en vejiga urinaria (33), útero (80) o estómago (107), produciéndose una distensión del órgano, provocado experimentalmente por la ligadura del conducto cístico en los guinea-pig (25). Ello desencadena una hiperplasia e incremento de la actividad proliferativa celular (36,37,38) o turn-over (39,40) de las células epiteliales con incremento de la secreción de moco (41,42) a la bilis previa aparición de las concrecciones calculosas. Esta proliferación se traduce en incremento de la actividad mitótica que sugiere que la síntesis de DNA pudiera ser un indicador sensible de la lesión.

Mientras que en la VB normal existe un nivel muy lento de renovación celular con mitosis excepcionales (7), visualizado en conejos (22), guinea pig (67) y otros (36). En la VB con cálculos de colesterol este nivel es muy alto mientras que no experimenta aumento cuando los cálculos son pigmentarios.

No se encontró correlación entre la síntesis de DNA producida por el epitelio y el volumen, peso o número de los cálculos, desechándose la idea de que la misma irritación mecánica de la mucosa por los mismos es el desencadenante de la actividad proliferativa.

PUTZ y cols (44) valoraron este índice de proliferación mediante el uso de timidina tritiada in vitro y autorradiografías, que cataloga la síntesis de DNA y el índice de mitosis por la incorporación de la misma al epitelio. (32)

Otros autores como SCOTT no han evidenciado este aumento de la proliferación celular tras la distensión de la VB. (45)

Muchas de las células se vuelven necróticas por la condensación del citoplasma y los cambios pinocitóticos que sufren. (46) Las células se transforman en pleomórficas con núcleos hipercromáticos y la lámina propia edematosa con una variación del patrón en empalizada del epitelio que habitualmente tiene esta capa, asociándose unas vesículas interepiteliales llenas de glicoproteínas. (41) Estas células teñidas fueron más abundantes y más densas en los valles que en las crestas. (41)

Hay evidencia de que la VB sufre alteraciones antes de que los cálculos se formen (47), por lo que es posible implicar a la mucosa en un papel activo de la litogénesis pues esta proliferación celular es un preludio de la metaplasia posterior que podría concluir en unas alteraciones cualitativas de la función de la VB (22) en el transporte de los fluidos. (25)

El término de COLECISTITIS CRÓNICA es utilizado por los clínicos referido a la sintomatología de la litiasis biliar y por los patólogos para describir la gran variedad de hallazgos histológicos en las vesículas con cálculos. (48) También se han encontrado cálculos en VB normales y se ha visto que cuanto mayor sea la clínica de la enfermedad mayores son las anormalidades histológicas, (48) demostrando que cuando las manifestaciones eran mínimas la función absorptiva de la VB era mejor que cuando eran severas.

Para la valoración más exacta de esta colecistitis crónica NAHRWOLD (48) planteó el estudio a microscopio óptico de varios parámetros que podrían ser índice de la enfermedad vesicular y de su importancia. Así la fibrosis, colesterosis, engrosamiento muscular, senos de R-A, infiltración celular de eosinófilos, células plasmáticas o inflamatorias. Según la existencia de estos factores en mayor o menor número y grado se denomina la inflamación leve moderada o severa.

#### CONFIRMACION EXPERIMENTAL.

Muchos autores han observado los cambios de la VB con cálculos producidos por dieta litogénica rica en colesterol y ácido cólico (49,50,51) ; aceite

de oliva en ratones; conejos (41) y otros (17,37) o con estímulos con Colecistoquinina-Pancreozimina (CCK-PZ) en humanos. (9)

LEE y cols (49) utilizaron tinciones diversas como PAS, Hematoxilina eosina (HE), PAS diastasa, Azul Alcian (AA) a pH=1 o pH=2.5, AA-PAS; hierro coloidal, PAS-hierro coloidal y aldehído fuchina (ALDA-FUC) y mucicarmina. (52)

Los cambios histológicos observados previamente a la formación de cálculos podrían ser una metaplasia glandular como fase final, a la que se llega por pseudoestratificación focal, con gran número de células degeneradas y forman S-RA en la fase de producción de cálculos. La célula tenía un núcleo grande en la base y con gránulos con glicoproteínas en el apex, teñibles con PAS y AA-pH=2.5. Las glándulas no se encontraron en el fundus ni en el cuerpo.

Con la dieta se producen de modo paralelo tanto los cambios histológicos como las alteraciones fisiológicas, siendo la proliferación celular y el incremento de la síntesis de glicoproteínas un indicador de la lesión (46) pero al transcurrir el tiempo la pared de la VB sufre modificaciones que le permiten tolerar la situación metabólica. (49)

#### OBSERVACION AL MICROSCOPIO ELECTRONICO.-

##### A) CELULA EPITELIAL.

Se produce un incremento del volumen de la célula con desaparición de la posición regular del núcleo localizándose en el polo basal, mientras que en el polo apical protuye a la luz formando BLEBS. En algunas células se encuentran la membrana plasmática rota con desintegración de la célula pérdida del contenido citoplasmático.

Presenta disminución o ausencia de microvillis, asumiéndose que ello además disminuye su capacidad absorbente. En la punta de las microvellosidades

hay sustancia mucosa glandular de densidad electrónica media observables a pesar de lavados previos de la VB con suero salino. (27) Se han visto más células secretoras de moco en la mucosa que en la normal. (53)

Las alteraciones de los microvillis se relacionan con las alteraciones de los microfilamentos intracitoplasmáticos, relacionados con la anoxia. Parece deberse a reacciones por la concentración variable del calcio que provoca modificaciones del citoesqueleto responsable de esa morfología celular. (28) Los blebs se producen al desaparecer las microvellosidades y los citoplasmas protuyen por el aumento del compartimento hídrico celular por las alteraciones de la composición de las sales biliares y por el incremento de la retención de líquidos. (27,28,54) Se produce también el ensanchamiento del espacio intercelular con microvillis que se interdigitan y desaparecen a veces. (55)

Algunos autores (29) han podido incluso visualizar pequeñas partículas cristalinas de 1 milimicra de diámetro en algunos casos, que pudieran representar estadios precoces de la formación de cálculos. Se llaman INCLUSIONES BERRY-LIKE características de cálculos más grandes pero no de microorganismos con los que pudieran confundirse. No se han realizado análisis de sus elementos por lo que no pueden ser comparados con los microcálculos. (29)

Existen diferencias respecto a las células normales en cuanto al número de gránulos secretorios, siendo en las VB más inflamadas, más abundantes y densos por lo que no se puede pensar que el Golgi, RE y mitocondrias tienen una actividad mitótica. (9,15,37) Su composición parece glucoproteica siendo positiva a la reacción de mucicarmina y al PAS. (22)

Se han visto 3 tipos diferentes de gránulos (2) y es curioso que también existen 3 sustancias que contribuyen a la formación del cálculo. (15) Estas vesículas preceden a la formación del cálculo. (56) CHAPMAN y cols (15) sugieren que los gránulos son eliminados a la luz, previa concentración y fabricación en las células, y ello serviría como núcleo a la formación de la concrección.

Otros cambios corresponden a agrandamiento de las cavidades del RER con pequeñas vacuolas incrustadas y de las cisternas perinucleares. Las mito-

condrias pueden hincharse. El Golgi se hiperplasia con cuerpos multivesiculares positivos a la fosfatasa ácida y demostrándose que corresponden a lisosomas. (25)

Los gránulos de secreción pueden ser de gran tamaño llegando a 3 x 0.5 milimicras o 2000 A con densidad electrónica constante y entre ellos hay estructuras de alta densidad de 500-2500 A. Hay otras inclusiones pequeñas cercanas al Golgi con membrana discontinua. Los grandes pueden aumentar de tamaño hasta 300 nanometros y se colocan en la periferia en la zona supranuclear del citoplasma (25), con membrana contínua, por lo que pueden considerarse vesículas secretorias. Tienen una presión hidrostática grande y podrían asimilarse a pequeños quistes de retención. (25) Los espacios entre las vesículas se llenan de material fibrilar o fragmentos de membrana. Estos gránulos contienen glicoproteínas teñidos por PAS o por otras técnicas como la FA-cromo A-plata, técnica donde se ven depósitos de plata densos en el complejo de Golgi además de en las gotas. (37) Estas glicoproteínas se sintetizan en las células principales en los ribosomas del RE y expulsado a la cavidad de éste, donde el Golgi lo engloba a modo de vesículas y lo modifica con moléculas como carbohidratos. Tras esta transformación se concentra dentro del gránulo secretorio típico donde se mantiene almacenado hasta la descarga por exocitosis a la luz vesicular.

Todos estos pasos se afectan por diferentes mecanismos al ser diferentes de la energía. Así la inhibición de la fosforilización oxidativa conduce a un bloqueo de la síntesis en el Golgi y la deplección de vitamina C también se altera. (50)

En otras glándulas como pancreáticas o parotídeas, se producen por estímulos similares gránulos zimógenos con contenido de amilasa. (37)

También se producen cambios a nivel del colesterol que se encuentra en más cantidad en la membrana celular que en el RE. Se puede bloquear así la conexión RE-Golgi y se agrandarían los gránulos secretorios al inhibirse el transporte de esos materiales a otros puntos. (50) Estos cambios se observan tras la dieta litógena en animales de experimentación al cabo de 30 horas, pero después decrece por el acostumbramiento.

La cualidad de lo excretado se ha valorado además de por las tinciones histoquímicas, por la medición del contenido en hexosamina tanto en la VB como en bilis o cálculos. (52)

Se debe a que el contenido de las mucosustancias contienen glucosamina y galactosamina, hexosaminas las dos, con lo que la identificación de estas sirve de índice para valorar su contenido. En VB con cálculos existe una elevación de esta concentración de hexosaminas.

#### OBSERVACION CON MICROSCOPIA DE BARRIDO O SACANNING:

La superficie de la mucosa muestra con este método (28) pliegues aplastados o engrosados con soluciones de continuidad de forma irregular e indentación de la superficie apical, con restos de células necróticas en la base. (29)

Entre las células hay otros grupos de células que ofrecen evaginaciones morulares que parecen gotas de secreción mucosa (4,37,57) que en ocasiones tienen además microcristales. Estas modificaciones se ven más en los bordes y vértice de los pliegues y en los pliegues localizados en la válvula de Heister. (30)

Estos hallazgos son semejantes a los vistos en las células caliciformes de la tráquea o intestino por lo que puede pensarse que en la colelitiasis existe una metaplasia mucosa del epitelio de revestimiento con imagen de secreción apocrina.

#### B) CELULA INTESTINAL.

Se han visto células enterocromafines en el 58% de las áreas metaplásicas y en el 47% de las glándulas antrales de las VB con litiasis. (58)  
Existen dos tipos de células según el tipo de gránulos secretorios que contienen. Ambas están limitadas por la membrana basal y por los vasos sanguíneos que la rodean.

##### - TIPO I:

Con grandes gránulos localizados tanto en la zona subnuclear del citoplasma con contenido homogéneo y electrón opaco a microscopía electrónica.

- TIPO II:

De forma más ovalada y pequeña rodeada por células epiteliales y con gránulos que se localizan sólo en la zona subnuclear y asociados a veces a la cara cóncava o maduradora del Golgi, de tamaño más reducido en las de tipo I. Su contenido no es homogéneo y de aspecto granular con un halo claro alrededor.(59)

Comparando estas células con las células enterocromafines del resto del tracto gastrointestinal, puede compararse la del tipo I a las productoras de serotonina de la mucosa gástrica (60) por el pleomorfismo de los gránulos que es típico. Las del tipo II se parecen a las células histamino-productoras. (61)

En los casos de metaplasia intestinal de la VB se produce tinción positiva con el PAS y el AA pero para establecer su naturaleza intestinal se atiende a estudios con antisuero de conejo contra la fracción microsomal de mucosa colónica humana, lo que sugiere que el epitelio contiene antígenos intestinales específicos y es una metaplasia intestinal verdadera. (62)

### 3.- ASPECTOS FUNCIONALES DE LA VB.-

#### 3.1.ABSORCION-CONCENTRACION.-

La VB normal es capaz de absorber 10-30% de su volumen en 1 hora a un ritmo de 3-6 ml/hora de suero salino. (20) pudiéndose concentrar la bilis hasta el 90% (63)

Se ha visto que la VB recién extirpada en ausencia de gradientes de tipo osmótico o hidrostático puede continuar la transferencia de líquidos desde la mucosa a la serosa durante 2-3 horas, según DIAMOND (64), pudiendo ir incluso en contra de dichos gradientes osmóticos. Tanto la serosa como

la capa muscular no participan en este transporte de fluidos. Estas láminas se comportan como una barrera de baja resistencia entre la solución externa y la membrana basal de las células epiteliales, no discriminando los diferentes tipos de iones. (65)

En las VB con hidrops se ha visto alteración del mecanismo de concentración (64) debiéndose a patología del funcionalismo normal de la pared de la VB que transporta solución isotónica e isoosmótica de cloruro sódico y bicarbonato respecto al plasma. La reabsorción del agua se acopla a estos solutos por lo que la bomba produce un transporte de sales eléctricamente neutro, siendo sin embargo más permeable a cationes que a aniones. (66)

En la VB humana se ha visto además un transporte activo de sodio en contra de gradientes eléctricos o químicos. (66)

El sustrato anatómico sobre el que se desarrolla este intercambio son los espacios intercelulares laterales que se consideran la sede del sistema de transporte salino (64,66,67,68), con sus digitaciones laterales. (25,63)

Como consecuencia de este proceso absortivo queda en la VB una solución de sustancias orgánicas (colorantes y sales de la bilis) con una concentración 10 veces mayor que la solución de origen. Por la inflamación estos espacios se dañan y sufren una distorsión del sistema de transporte.

DUMONT y cols. (1) han estudiado la función concentradora de la VB comparándola con hallazgos inflamatorios basados en fibrosis, divertículos mucosos de R-A o C-L, colesterosis, engrosamiento de la capa muscular, presencia de células eosinófilas, infiltración de células inflamatorias o plasmáticas y no se encontraron diferencias significativas entre la intensidad de dicha anomalía histológica y el funcionamiento de la VB. Sin embargo otros estudios como los de SVANVIK en 1981 (69) sugieren que el daño de la VB puede alterar su función.

NAHRWOLD (48,65) ha estudiado el potencial transmural eléctrico y el aspecto histológico de la VB, observando que su capacidad absortiva está relacionada directamente con el grado de modificaciones histológicas, llegando a la conclusión de que dicha capacidad de absorción de la VB no es un fenómeno del todo o nada sino que es proporcional. Se reduce en el 30% en los pacientes con litiasis sintomáticas. (2)



Es posible plantearse la duda de si es posible o no que los cálculos se desarrollen en una VB humana fisiológicamente normal (70), pues existe la evidencia de que la producción de una bilis litogénica en el hígado es la primera causa de colelitiasis. (1)

Esta capacidad concentradora de la VB se convierte en una amenaza cuando la bilis está sobresaturada o tiene más colesterol, de modo que cuanto mayor sea el poder concentrador mayor será el peligro, creyéndose que sí pueden darse cálculos en una VB con concentración normal. (65)

Para que exista esta concentración es indispensable la existencia de iones como el Na y el Ca sin los cuales no hay transporte, quedándose estrechados los espacios intercelulares, mientras que en las VB que sí transportan se encuentran muy distendidos. Cuando se reponen los iones se restaura el proceso.

Se han emitido diferentes teorías para explicar el fenómeno absorptivo de la VB pues no puede hacerse por los conceptos clásicos de la ósmosis. Se han estudiado por Na marcado o por métodos matemáticos sobre el CINA. (71)

La teoría de CURRAN (72,73) es que la concentración es un transporte activo a través de la membrana celular lateral de los solutos, por lo que en el espacio intercelular lateral se produce elevación de la concentración de los mismos. (FIGURA N° 3) Debido al gradiente osmótico existente, el agua pasa a la célula y llega a distender este espacio aumentando la presión hidrostática, lo que impulsa a la solución a pasar por la lámina basal a través de hendiduras hacia la submucosa. (2) Se podría comparar este sistema a un modelo experimental con una primera membrana semipermeable y otra barrera no selectiva. (74)

Otra hipótesis corresponde a la de DIAMOND (75) basado en el GRADIENTE DE POSICION. En ella se considera que el soluto es bombeado activamente a los canales laterales formándose un contenido hipertónico y entonces, penetra el agua por la fuerza del gradiente osmótico que mantiene esta posición. Posteriormente, una solución de osmolalidad fijada sale de la célula. (FIGURA N° 4) Esta teoría parece de más fisiologismo que la anterior, por lo que es más aceptada.

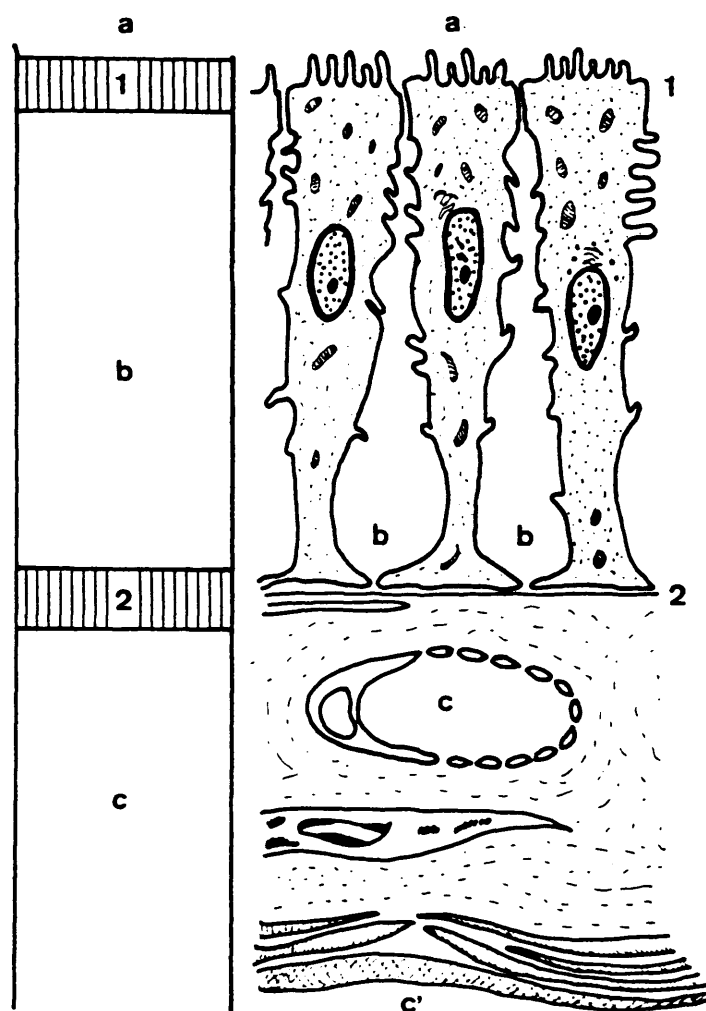
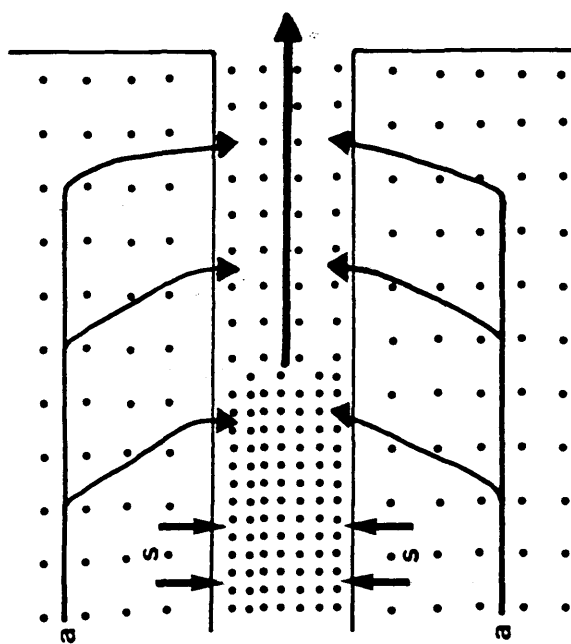


FIGURA N° 3.- Representación de la teoría de Curran sobre el mecanismo de absorción y concentración de la mucosa de la VB. 1: membrana semipermeable. 2: barrera no selectiva. a: luz vesicular. b: espacio intercelular. c: espacio vascular. c': lámina basal. Tomado de CURRAN (72)



**FIGURA Nº 4.-** Esquema de la teoría de Diamond del gradiente por flujo osmótico, sobre la concentración de la bilis por la VB, a: agua, s: solutos.  
Tomado de DIAMOND .(75)

La idea de que este transporte se debe a fenómenos de pinocitosis no se aceptan por carecer de sustratos basados en hallazgos microscópicos y además por la selectividad existente de los procesos absortivos según los solutos. (66)

La capacidad absortiva y concentradora de la VB puede ser valorada por la PRUEBA DE CONCENTRACION DE SALES HALOGENAS DE LA FENOF TALEINA (PRUEBA DE GRAHAM-COLE), utilizada en la clínica por ser sustancias opacas a la radiografía. Cuando no se visualiza radiológicamente indica que el órgano está enfermo o excluido, siendo la base de la colecistografía clínica. Si embargo no se considera muy fiable pues mientras la no visualización excluye a un paciente con cambios histológicos mínimos y anomalías absortivas, la visualización no excluye a pacientes con dichas anomalías y cambios histológicos severos.

Es difícil estudiar esta función con métodos in vitro, puesto que sufre influencias de la vascularización sanguínea, drenaje linfático y factores nerviosos y endocrinos. (69)

Con técnicas autoradiográficas de la VB de conejo (38) se ha observado una mayor actividad en el transporte de fluidos en la cresta de la mucosa y sin embargo decrece en la zona del valle de la vellosidad mucosa. Es una migración semejante a las de las células intestinales.

### 3.2. SECRECCION.-

Se describe la función secretora de la VB en 1951 por GOMPPER (76) siendo poco conocida, al contrario que la capacidad absortiva del mismo órgano. Este autor estudiando diferentes especies observa que existe secreción de productos a la bilis e incluso las llega a identificar como mucosustancias o mucoproteínas (MCP). Además se aislaron otras sustancias con efectos biológicos diversos, como son: activación de la lipasa pancreática, coleresis, alteración del metabolismo hepático del colesterol y efectos en la secreción gástrica. (26)

Por estudios electroforéticos en la bilis vesicular y hepática de humanos se ha visto que existen diferencias cualitativas atribuidas a la secreción de un complejo lipoproteico por el epitelio de la VB (77) y otro que hace protusión de unas masas citoplasmáticas hacia la luz de la VB evidenciados en perros o conejos. (8)

Esta secreción sufre modificaciones por diferentes factores:

#### 1.- INFLAMACION CRONICA DE LA VB.-

Según estudios de WOOD y STAMFORD (78) se ha sugerido que una actividad anormal de las prostaglandinas (Pg) en las VB inflamadas crónicamente (26) puede ser la razón del cambio en el fluido con la elevación de la secreción hacia la luz. (69,79)

Se han visto sintetizadas en la pared de la VB y uno de sus efectos locales es la inducción de la secreción de moco a la luz de la misma, así como la disminución de su capacidad absorbente. (80,81)

Estos efectos se han comparado a los de la toxina colérica y se ha visto que ésta produce una elevación del adenosín 3' -5' cíclico y que ello induce a un transporte de fluidos dentro de la luz de la VB. (82)  
Este líquido es claro, alcalino, viscoso, con unos 40-50 mEq/l de bicarbonato, cationes como los del plasma y concentración de proteínas que decrece con el tiempo desde 2.5-3.5 mg/ml a 0.5 mg/ml. (79)

En animales, se ha observado que la Pg tipo E sobretodo posee un efecto colerético con elevación del flujo de la bilis y efecto secretina-like en gatos, además de reducir la presión arterial, en contraste con la elevación que produce en los conejos y humanos. (83)

#### 2.- COLECISTITIS AGUDA E HIDROPS.-

La inflamación con obstrucción del conducto cístico produce un hidrops

que se considera productor de cambios en la pared vesicular de manera que se invierte la dirección del flujo en la mucosa. (69) Estos cambios también se observan en VB con litiasis sin hidrops no teniendo ninguna absorción o siendo mínima. (55)

La colecistitis aguda es una complicación de la VB con cálculos que se produce en el 25% de los casos y se bloquea en ellas el conducto cístico por atascamiento de uno de ellos, evitando tanto la entrada como la salida de la bilis.

En un 28-60 % además se encuentra sobrecrecimiento bacteriano (55) aunque a veces es una complicación secundaria o se produce en una inflamación que era aséptica inicialmente. (84)

### 3.- AYUNO.-

En estudios sobre el ratón, sometiéndoles a ayuno y posterior renutrición WHALIN (17) ha mostrado una síntesis aumentada y una descarga de gránulos de glicoproteínas (47), estimando que dicha actividad secretoria se influye por el estado nutricional del animal y por la composición cualitativa de la dieta administrada. Esto se demostró con la prueba de la  $H_3$ -Galactosa intraperitoneal con autorradiografía que observó mayor tinción en zonas apicales de la célula y supranucleares y conforme transcurre el tiempo se colocan en la superficie celular apical.

Tras la renutrición de 12 horas la tinción se vuelve de la misma intensidad que en los controles (17). Otros autores sin embargo observan que con el ayuno las vesículas son escasas y pequeñas, siendo raras las vacuolas, normalizándose con la realimentación (9). El ayuno provoca también mayor renovación celular por la hiperplasia compensadora debido a un ataque de la bilis que en estas ocasiones contiene más cantidad de colesterol. (47)

### 4.- DIETA LITOGÉNICA.-

Con la administración de dieta litogénica rica en colesterol y ácidos biliares se desarrolla la hiperplasia de los pliegues con profundas invaginaciones y criptas, incrementándose también los gránulos de secreción en número, tanto a nivel apical como subapical y son distendidos y con numerosas vesículas en la vecindad del aparato de Golgi. (17) Estos cambios se producen más intensamente en las células de las criptas.

Cuando se les inyecta la  $H_2$ -Galactosa se tiñe tanto el aparato de Golgi como las zonas subapicales o apicales de las células de modo intenso. Experimentalmente en perros se ha observado que las lesiones afectan al epitelio en el animal mientras que en el hombre lo hacen en la submucosa (85) siendo similares el resto de cambios sufridos.

En el ratón con la administración de dieta con colesisterina y ácido cólico con o sin 2-acetamidofluorena se han visto atipias además de aparición de carcinoma en el colédoco o ampolla. (85)

##### 5.- ADMINISTRACION DE LINCOMICINA.-

La aplicación experimental de lincomicina en los guinea-pig (36) produce unos cambios similares a los de la dieta litogénica en el conejo (25). Es considerado como un ataque tóxico agudo que puede desembocar en una metaplasia con formación glandular, que podría tenerse en cuenta en el hombre. (25,86,87)

Un ataque en el epitelio siempre que sea suficientemente intenso produce inflamación. En el caso de la lincomicina se producen vesículas interepiteliales que surgen en áreas de displasia epitelial marcada y algunas en comunicación con la luz. (36) Su contenido se tiñe por el PAS, AA pH:2.5 y AA pH:1 así como con el Fe-coloidal muy fuertemente. Con el ALDA-Fuc se tiñe menos el contenido y sin embargo lo hacen de modo intenso el borde y los gránulos apicales. Estas vesículas se rodean por células dando una imagen en roseta.

Típico de la lincomicina es la producción de lesiones microscópicas

del tipo NODULOS PURULENTOS que son focos de leucocitos que infiltran alrededor de un área de ulceración.

Con la timidina tritiada se aumenta el índice de tinción conforme pasa el tiempo de un 3% a un 7% siendo mayor en las células de la superficie.

#### INFLUENCIA DE LA SECRECCION EN LA LITOGENESIS.-

La inversión del flujo de líquidos dentro de la pared de la VB con cálculos, vista en conejos y guinea-pig, con elevación de la secrección de moco se debe a las Pg. Son mediadores de la inflamación y producen la abolición de la absorción de agua y una contracción de la musculatura vesicular. (26)

La inhibición de las Pg por las aplicación de indometacina a dosis de  $0.25 \text{ mg/mm}^3$  en la solución tiene efecto inhibitor sobre la enzima prostaglandín-sintetasa produciendo una disminución de la presión intraluminal de la VB con efecto beneficioso sobre el dolor de origen biliar (88) y la inversión de la secrección continua de fluidos con producción de relajación de la VB. (69) La aplicación de la indometacina consigue restituir en un 80% la función concentradora vesicular.

Se han visto niveles elevados de las Pg en mucosa de VB fundamentalmente cuando tienen cálculos múltiples más que si es único y es más intenso en la mucosa que en la pared muscular (26) pudiendo producirse de 3 a 5 veces más que basalmente.

Con la cromatografía de los extractos mucosos se han mostrado unas sustancias que resultan ser indistinguibles de la PgE y F primarias con un componente Pg-D<sub>2</sub> like.

El nivel de Pg sintetizado es mayor en VB no visualizadas con la cole-



cistograffa oral, sin embargo su significación patofisiológica es difícil de evaluar en la colecistitis crónica, ya que no hay especímenes de VB normal para su comparación. (26)

Como favorecedores del aumento de Pg se han implicado diferentes sustancias. La tripsina del jugo pancreático (84), secretina (89), polipéptido intestinal vasoactivo (90) y toxina colérica (82).

El mediador considerado más importante es el fosfolípido lecitina que por sus propiedades sobre la superficie de las células puede inducir cambios en las membranas biológicas y dar daño con respuesta inflamatoria y alterar los flujos de fluidos de la pared. El mecanismo de lesión sugerido por SJÖDAHL y cols (84) se basa en la conversión de la lecitina mediante la fosfolipasa lisosomal a su lisocomponente o lisolecitina, que debido a estas propiedades citotóxicas puede dañar la célula epitelial, por lo que se relaciona con la patogénesis de la colecistitis. (84,91) La lisolecitina se degrada por una fosfolipasa pero en menos cuantía de lo que se genera.

En los enfermos con colecistitis aguda tienen una cantidad de fosfolípidos en la bilis baja, pero con elevación de la relación lisolecitina/lecitina. La lisolecitina no está aumentada en la pared.

Estudiando este aspecto, SJÖDAHL (84) incubó VB con lecitina marcada con  $C_{14}$  y mostraron elevación de esta relación lisolecitina/lecitina demostrándose que la VB con el cístico ocluido sufre formación de lisolecitina a partir de sus componentes en la misma pared de la VB por la fosfolipasa A que es termoestable a pH ácido óptimo. Esta enzima se encuentra en los lisosomas del epitelio de las VB humanas.

Un ácido graso suministrado por los fosfolípidos del tejido de la VB o de la bilis (69) puede ser el precursor que debido a la fosfolipasa A se transforme en Pg. Los estímulos de esta transformación pueden ser químicos o mecánicos (88), y en ocasiones se asocia la inflamación crónica con la obstrucción de la VB. Así un ataque de tipo químico, mecánico o bacteriológico, puede provocar el aumento de la Pg. (69)

La lisolecitina también puede formarse por la beta-glucouronidasa, que además deconjugla la bilirrubina, siendo las sales biliares trasformadas en productos tóxicos. No se han encontrado en bilis de VB con cálculos libres, pero sí cuando se ha ocluido el cístico.

La Hipótesis de SJÖDAHL (84) respecto a la fisiopatología de los cálculos es sumamente atractiva. Debido al atascamiento del cístico y acúmulo de la bilis en la VB se produce daño en el epitelio que por la citotoxicidad provoca salida de enzimas lisosomales a la luz. Entre ellas se encuentra la fosfolipasa A lisosomal que transforma la lecitina en lisolecitina y se expulsa a la bilis, donde se encuentra en cantidad abundante. Si la transformación es superior a la degradación se transforma excesiva cantidad de lisolecitina que por sus efectos puede lesionar la membrana celular de la mucosa de la VB y conducir a un incremento de la permeabilidad de la pared con liberación de más cantidad de enzimas lisosomales del epitelio a la luz. Estas enzimas, la lisolecitina y las sales biliares causan un daño tisular con reacciones inflamatorias en la pared de la VB y con mediadores de Pg que provocan secrección excesiva de moco en la bilis.

El carácter agudo o crónico de este proceso así como su intensidad resultarían de la interacción entre actividades promotoras o preventivas de dicha inflamación. Tras esta a veces se produce sobrecrecimiento bacteriano.

### 3.3 REGULACION DE LA FUNCION.-

La VB sufre acúmulo de la bilis en los periodos interdigestivos, con relajación de la válvula de HEISTER y vaciamiento de la bilis al intestino durante las comidas. Este hecho se regula por factores nerviosos y endocrinos:

#### A) HORMONAS.

##### - COLECISTOQUININA- PANCREOZIMINA (CCK-PZ):

Por la ingesta se estimula su producción (92) y hace que se vacíe la

VB por contracción de su capa muscular y disminución de la resistencia al flujo en el esfínter de Oddi.

- GASTRINA I Y II:

Disminuye la resistencia del esfínter (93) aunque su función no es bien conocida.

- SECRETINA:

Se conoce lo mismo que de la gastrina. (94)

- CERULINA:

Tiene un potencial colecistoquinético y ha sido aislado de una rana australina llamada *HYLA CAERULEA*. (66,92)

- SEROTONINA:

Se conoce como estimuladora de la secreción de moco. (95)

- GLUCAGON:

Actúa como relajante de la musculatura y produce dilatación de la VB.

- HISTAMINA:

Incrementa la presión en la VB en algunas especies por lo que fármacos bloqueantes de los receptores  $H_2$  acrecientan la respuesta de la CCK-PZ. (96)

B) SISTEMA NERVIOSO PERIFERICO.

La vagotomía total altera la concentración y disminuye su tono por lo que tiene efecto experimental sobre la formación de cálculos (52,57). La concentración de hexosamina como factor indicador del contenido de mucina no se modifica con la vagotomía.

En humanos, se ha podido observar, que tras la vagotomía por cirugía

del ulcus se desarrolla litiasis más frecuentemente (97,98), por disminuir la presión de la VB, dado que el nervio vago mantiene esa presión en condiciones normales. (52,99)

El nervio simpático por el mismo motivo inhibe la contracción vesicular en condiciones basales. (98)

## II.- ESTUDIO DE LA BILIS.

El estudio de la bilis en su estado de normalidad es importante para posteriormente poder determinar las alteraciones que la misma sufre en la enfermedad litíásica. Por ello se hará una revisión en ambos estados.

#### 1.- BILIS NORMAL.- \*\*\*\*\*

##### 1.1.- COMPOSICION QUIMICA.

La bilis es una solución compleja e isotónica que contiene agua, sales biliares, pigmentos biliares, colesterol, fosfolípidos y electrolitos inorgánicos. Además son excretados en ella diversos metabolitos de hormonas (tiroideas, esteroides) o porfirinas. (100)

Contiene 3 tipos de componentes según su concentración sea igual en la bilis que en el plasma (Na, K, Ca y glucosa); superior a la del plasma (sales y pigmentos biliares, colorantes como la bromosulfotaleína, fluoresceína y rosa de Bengala, cetrina) y las que tienen concentración inferior en la bilis que en el plasma (Fosfatasa alcalina, inulina, sucrosa, fosfatos, colesterol, fosfolípidos y mucosustancias)

La bilis se forma en la célula hepática o hepatocito y sus principales componentes como son las sales biliares derivan del colesterol. Posteriormente pasa a la VB sufriendo allí modificaciones por la electronegatividad de su luz y por la reabsorción de iones como Ca, Na, Cl, K y bicarbonato quedando con un pH menor que la bilis hepática aunque permanece isotónica. (101) Este proceso es activo y requiere de la bomba de Na. El agua sigue a los electrolitos en este proceso y de modo pasivo por lo que las sales biliares, la bilirrubina y el colesterol, para los que la VB es impermeable, sufren concentración de hasta 10 veces. Por ello el volumen final de la bilis vesicular es sólo el 10% del inicial (102) por la absorción de ese 90% de agua. (101) Al mismo tiempo gracias al mecanismo micelar la bilis queda en estado isoosmótico con el plasma.

Factores influyentes como la secretina y la gastrina aumentan la secreción del bicarbonato y del Cl así como el débito biliar de la VB pero no las sales biliares. (100,102)

Debido a estos procesos, la bilis vesicular contiene los mismos componentes que la bilis hepática pero en mayor concentración. (103) ( TABLA I)

Los principales componentes son: ( FIGURA Nº 5)

#### A) SALES BILIARES.

Son el componente principal y derivan del colesterol por procesos en el hepatocito. Puede originarse de dos modos: a partir del acetyl Co-A de otras vías metabólicas y del ingerido por la dieta. Este colesterol mediante procesos de hidroxilación y oxidación en las mitocondrias produce ácido cólico (trihidroxi) y ácido quenodesoxicólico (dihidroxi) que se conjugan con la taurina y glicina dando sales que forman micelas que son excretadas a la bilis. (100, 104) Existen diferentes tipos de micelas según sea dihidroxi o trihidroxi siendo estas últimas más estables. (105)

Estas sales facilitan la solubilización acuosa de otras sustancias insolubles como colesterol, lecitina y ácidos grasos y que gracias a esa acción hidrópica, los mantiene en disolución evitando la precipitación de los mismos.

#### B) COLESTEROL.

Se encuentra disuelto en la bilis en una proporción mayor a la correspondiente a su índice de solubilidad, debido a la presencia de sales biliares y ácidos grasos que lo mantienen en disolución. Es el componente más importante en la formación de cálculos.

#### C) PIGMENTOS.

Los pigmentos se componen de bilirrubina y son los causantes del color oro de la bilis. La biliverdina le da el color verde, siendo derivado por oxidación de la bilirrubina producida en la VB.

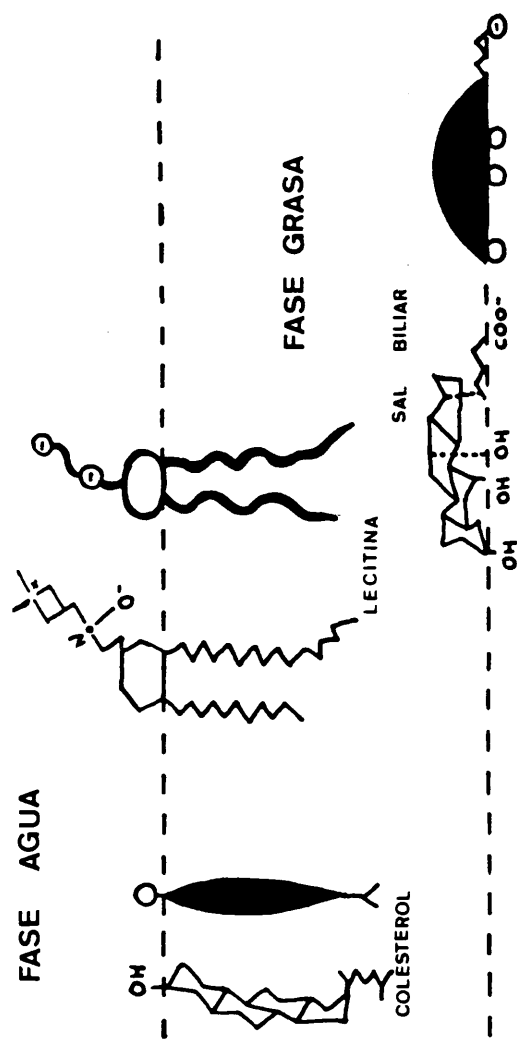


FIGURA N° 5.- Fórmulas en perspectiva y de modo esquemático de los 3 componentes principales de la bilis.



	BILIS HEPATICA	BILIS VESICULAR
AGUA	97.51 %	83.98 %
MUCINA + PIGMENTOS	0.53	4.44
SALES BILIARES	0.93	8.70
ACIDOS GRASOS	0.12	0.85
COLESTEROL	0.06	0.85
LECITINA	0.02	0.14
SALES INORGANICAS	0.83	1.02

**TABLA I.-** Concentración de los distintos elementos en la bilis vesicular y hepática.  
Tomado de HAMMARSTEN. (103)

Esta bilirrubina se encuentra de modo conjugado en la bilis formando diglucourónido, monoglucourónido o sulfato, solubles en agua, así como una pequeña cantidad de bilirrubina libre. Este compuesto puede hidrolizarse por la beta-glucouronidasa de algunas bacterias en bilirrubina libre y ácido glucourónico, (105) favoreciendo la precipitación de la bilirrubina en la bilis.

#### D) IONES Y SALES INORGANICAS.

El Ca, Na y el K se concentran en la VB. El K aumenta de 5 mEq/l de la bilis hepática a 9 en la VB. El Ca de 5 a 12, pudiendo pasar a la luz de la VB por su pared. (106) El Cl y el bicarbonato sin embargo están más bajos que en la hepática con 28 mEq/l. (101,107)

#### E) MUCOSUSTANCIAS.

Más escasas en cantidad y poco conocidas.

### 1.2.- FORMACION DE MICELAS.

El interés de la bilis reside en la capacidad de disolución de un lípido como el colesterol en una solución acuosa del 85-90% de agua. Ello hace que exista un desequilibrio en la bilis que puede ser alterado por diferentes circunstancias favoreciendo la precipitación de sustancias y por ende, la formación de cálculos.

Los cálculos pueden clasificarse según su actividad biológica (108, 109, 110) en varios tipos fundamentales para poder conocer la formación de la micela y su comportamiento. Se acepta la clasificación de SMALL. ( FIGURA Nº 6)

Así mismo existen también diferentes tipos de micelas mixtas según el tipo de lípido incluido. (108,111) En la bilis parece existir el tipo de micela C con inclusión de lípidos anfipáticos insolubles no hinchables tipo II.( FIGURA Nº 7)


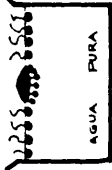
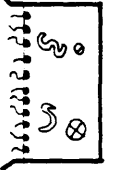
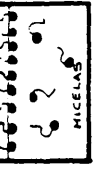

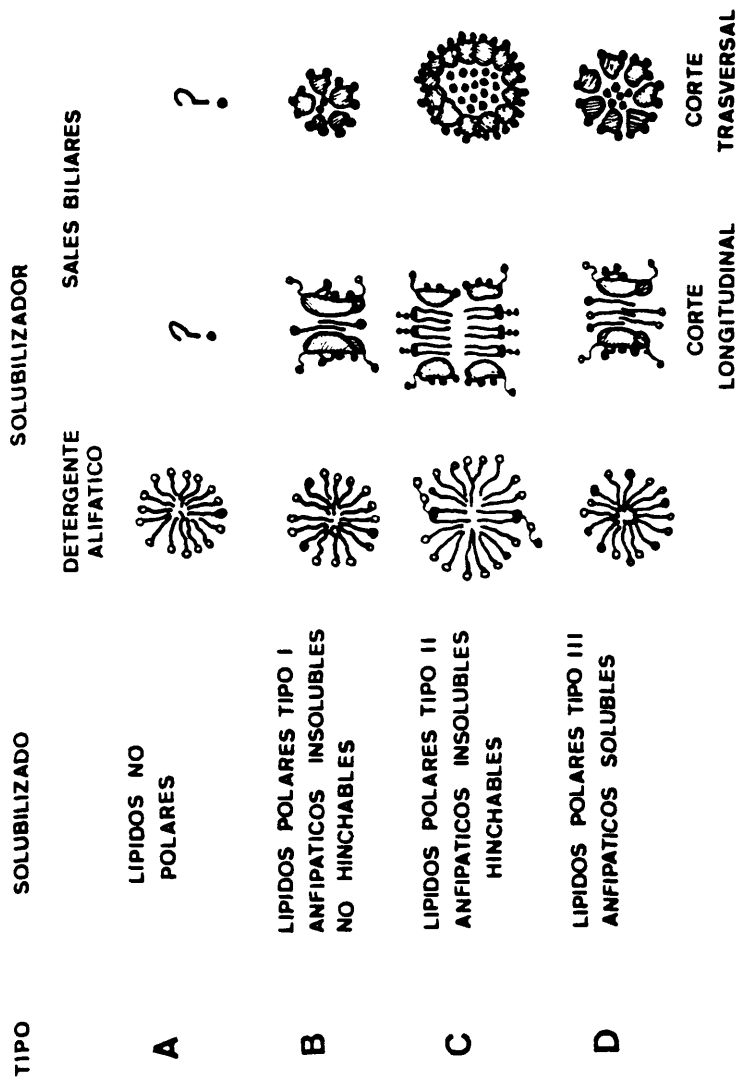
CLASE	INTERACCIONES CON EL AGUA	EJEMPLOS
LIPIDOS NO POLARES		oleato o linoleato de colesterol, oleato de palmitol.
LIPIDOS POLARES		trigliceridos, colesterol, vitaminas A,D,E y K.
I: anfipático insoluble hinchable.		fosfolipidos, monoglicéridos, gliceril.
II: anfipáticos solubles.		lisolecitina, detergentes.
III: anfipáticos solubles.		sales biliares libres o conjugados, saponinas.
A) con mesomorfismo isotrópico.		
B) sin mesomorfismo isotrópico.		

FIGURA Nº 6.- Clasificación de los lípidos según la actividad biológica.  
Tomado de ADMIRAND y SMALL. (109, 110 )



**FIGURA Nº 7.-** Tipos de micelas mixtas, según el tipo de lípidos que contienen. En la billis el existente es el tipo C. Tomado de SMALL. ( 108)

El colesterol es una molécula anfipática pues tiene dos polos diferentes, uno hidrófilo y otro lipófilo o hidrófugo. (108,112) El grupo polar hace que se orienten las moléculas en una interfase aire-agua aunque son débiles para hacerlos solubles en agua. A pesar de mezclarse con el agua se separan formando una fase grasa.

El colesterol se solubiliza en 20 nanogramos /litro de agua pero su concentración en la bilis es de 40, por lo que su mantenimiento se debe a la presencia de otros lípidos anfipáticos cual son las sales biliares y la lecitina. Las sales biliares actúan como detergentes naturales pues son lípidos polares tipo III o anfipáticos solubles. (81,108,111,112) Estos detergentes son sustancias capaces de dispersar lípidos insolubles en agua en soluciones acuosas homogéneas. Producen una disminución de la tensión superficial de la interfase y forman agregados polimorfos que es lo denominado MICELAS.

Las micelas presentan una zona polar o hidrófila y otra no polar o hidrófuga en la molécula. En el centro de la micela se colocan las sustancias insolubles en agua de modo que quedan solubilizadas. Son de tamaño microscópico con 30-100 Å. (108)

Si existe un número alto de moléculas de sales biliares, la tensión superficial en la interfase desciende y las moléculas individuales se pueden encontrar libremente en la solución dando una solución ideal sin separación entre fase acuosa y lipídica.

Las fuerzas atractivas entre las mitades esteroideas son fuertes o FUERZAS DE VAN DER WAAL, pero son ineficaces por las pocas moléculas y su distancia. Cuando existe un número más elevado y se aproximan entre sí, las fuerzas ya pueden actuar y se originan dímeros, trímeros y alcanzan una concentración determinada o CONCENTRACION MICELAR CRITICA de 1.5-2 mM/l uniéndose su parte esteroidea y quedando la parte soluble mirando a la solución. Estos agregados polimoleculares son las micelas.

Esta concentración micelar crítica no es constante y sufre variaciones con la temperatura, concentración iónica del medio y tipo de sal biliar.(108,112) (FIGURA Nº 8)

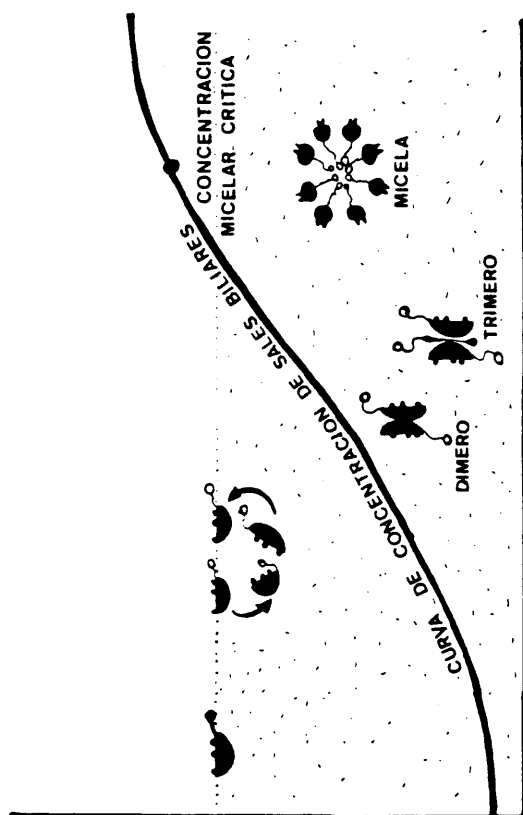


FIGURA Nº 8 .- Disposición de las sales biliares en un medio acuoso similar al de la bilis, según su concentración.

Dentro de estas micelas simples se encuentra disuelto el colesterol pero en cantidad mínima. Precisa 100 moléculas de sales biliares para disolver 3 de colesterol. para elevar esta solubilización se forman MICELAS MIXTAS que incorporan la lecitina a las micela de las sales biliares. (87) La lecitina es el fosfolípido principal de la bilis y corresponde a un lípido tipo II o anfipático insoluble hinchable. Posee una parte de su molécula larga con apatencia por el agua que no le permite la solubilización acuosa pero sí una hinchazón. (113) El agua se introduce entre las capas de lecitina formando los denominados CRISTALES LIQUIDOS que son agregados laminares o cilíndricos. (91) De ese modo las moléculas se colocan entre las láminas de fosfolípidos y se consigue mantener en disolución una mayor cantidad de colesterol.

Las sales biliares se disponen formando un manguito que rodea un segmento del cilindro del cristal líquido colocándose los grupos hidrófilos hacia el exterior y en contacto con el agua ambiente mientras que los lipófilos se disponen hacia el interior del cilindro. Estos cilindros de cristales tienen un aspecto de cigarro puro cuyos extremos se cubren de sales biliares. (FIGURA Nº 9)

La cohesión de las micelas se deben a la unión de los grupos hidrófugos de los cuerpos esteroideos y las de las sales biliares de las cadenas hidrocarbonadas de la lecitina. (112)

Las fuerzas de repulsión de la micela se ha visto experimentalmente que se pueden alterar por adicción de electrolitos ya que disminuye el contenido líquido entre las partículas favoreciendo la aglutinación. Estas fuerzas se vencen añadiendo al medio proteínas o polielectrolitos que actúan de nexo de unión entre cristales y siempre que no se someta a movimiento el medio. (114) Ello es base para pensar que las mucoproteínas hacen de puentes macromoleculares polielectrolíticos entre las micelas, favorecidos por los iones que contiene la bilis vesicular, como las demás proteínas y favorecido por la motilidad vesicular. (112)

Como índice de solubilización ISACKSON establece el 1:11, estando la bilis normal debajo del mismo según demostración de ADMIRAND Y

MICELA MIXTA

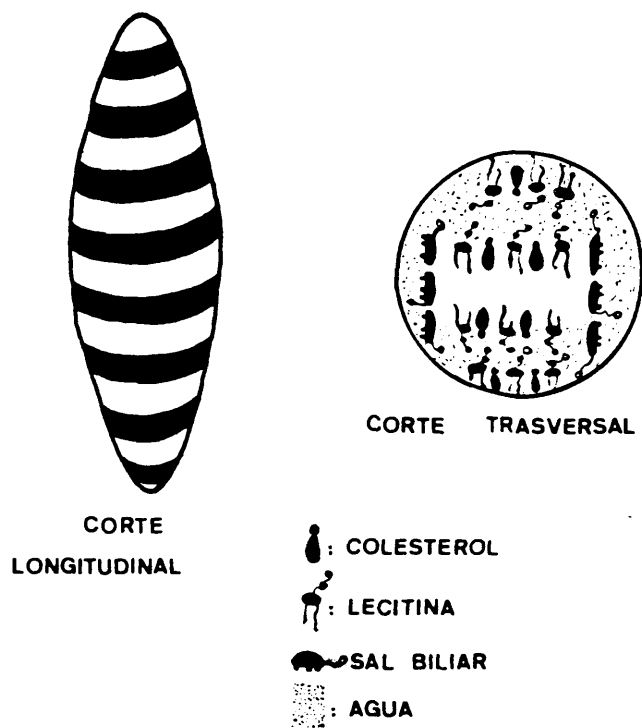


FIGURA Nº 9 .- Micela mixta esquemáticamente representada.  
Se observan las capas alternantes de lípidos y agua y la cubierta externa de la sal biliar.



SMALL. (115) Fue el mismo ISACKSON en 1954 el primero en determinar que lo importante en la solubilización del colesterol, más que las cifras relativas era la relación entre el colesterol, sales biliares y fosfolípidos. (112,116) Si el colesterol aumenta su concentración rompe la proporción, sufriendo precipitación.

ADMIRAND Y SMALL en 1968 (112,115) emplean un diagrama relacionando los 3 componentes y delimitando una zona de modo que si la unión de los 3 valores se encontraba dentro de la fase micelar el colesterol se encontraba en solución, pero si era sobresaturada se encuentra fuera. Es base de una importante teoría sobre la litogenicidad de la bilis. (FIGURA Nº 10)

La bilis además en la VB sufre una concentración de los lípidos a medida que se difunde agua a través de las paredes. De ese modo puede decirse que el cociente de ISACKSON se altera por el desequilibrio de los lípidos, colaborando de modo importante a la litopoyesis la propia VB en tres aspectos:

- aportando el núcleo o matriz de las mucoproteínas.
- dejando a la bilis como un medio en reposo favorecedor de la cristalización del colesterol.
- dando una concentración iónica mayor que altere la capacidad micelante de las sales biliares y que facilite la producción de cristales. (117,118)

### 1.3.- CICLO ENTEROHEPÁTICO.

Las sales biliares pasan en su mayor parte a la bilis de la VB pero el resto pasa a través del colédoco al duodeno. El ciclo enterohepático de la bilis es el mecanismo para economizar estos detergentes hepáticos tan importante para el mantenimiento de la solubilización del colesterol. (119) En la rata se ha podido observar que el 85% de las sales se encuentran en la luz intestinal, 10-12% en el tracto digestivo y sólo 3-5% en el hígado. (120)

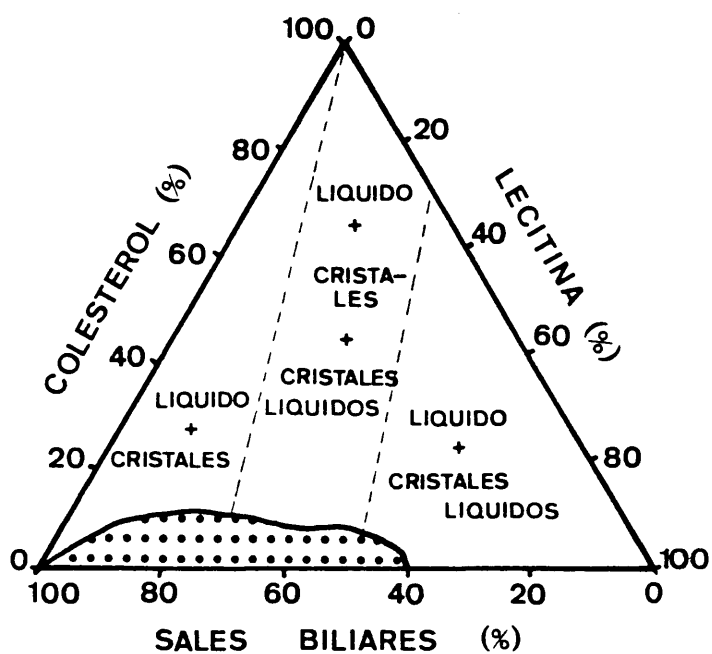


FIGURA Nº 10.- Modelo del triángulo de Small. Representa el estado físico en la bilis de las combinaciones de colesterol, lecitina y sales biliares, para una concentración hídrica del 90% standard en la bilis.

Además de la bilis que pasa directamente, debido a una respuesta a la ingesta y a la CCK-PZ se contrae la VB y se produce un vaciamiento de la bilis hacia el intestino. En él se absorben el 97% de los 3-5 grs. que existen en total y el resto se excreta oscilando entre 200-600 mg/día y con una vida media de 2-3 días. (119,121) En el yeyuno se produce absorción pasiva debido al pH, concentración, polaridad y tamaño de la molécula.

Los ácidos biliares libres se absorben de 8-10 veces más rápido que los conjugados. Por medios pasivos también pueden absorberse en estómago y en cólon. (119,122)

El nivel de excreción de las sales biliares es función del pool de sales y del número de ciclos enterohepáticos diarios, siendo ambos inversos para tratar de mantener constante la cantidad de sales biliares. (123) Por ello el nivel descendido de las sales observado en los litíasicos o con bilis litogénica pueden ser debido a disminución del pool o a mayor número de ciclos enterohepáticos aumentando así las pérdidas.

En el ileon terminal existe un sistema activo de transporte con capacidad limitada pues si se sobrecarga en exceso se satura. En él se absorben la mayoría de las sales biliares, debido a que existe el máximo de bacilos anaerobios. ( $10^6$ - $10^8$ ) (121) Cuando es ineficaz, el yeyuno y el ileon absorben los ácidos. (124,125) El sobrante de sales va al cólon y allí interfiere con la absorción del agua provocando una diarrea acuosa. (126) Los ácidos dihidroxi se absorben por difusión pasiva a lo largo del intestino. (127,128)

En sujetos normales, la pérdida de sales se correlaciona con un sistema CONTRARREGULADOR por el que aumentaría la síntesis para mantener un nivel constante. (121,129) Este equilibrio puede alterarse por fallo en la síntesis adecuada como en alteraciones hepáticas entre las que se encuentra la falta de enzima 7-hidroxilasa, con una mayor cantidad de bilis litogénica en enfermos con hepatopatía crónica. (130,131)

Según SMALL (121) el ciclo enterohepático puede dividirse en una FASE PORTAL primera en que se secretan las sales por el hígado y pasan al intesti-

no al sistema portal y de allí al hígado y a la circulación general donde se encuentra menos del 5%, con un nivel de 2-4 micromoles /l. (119)

La FASE EXTRAPORTAL parte de los linfáticos intestinales, a la circulación general y por la arteria hepática al hígado donde se secreta a la bilis. Otros lípidos como el colesterol o los fosfolípidos van al ciclo enterohepático extra-portal. Los pigmentos biliares (132); folatos (133) y la vitamina B-12 así como esteroides estrogénicos tienen un ciclo limitado.

Los esteroides, antibióticos (135), barbitúricos, glutetimida, digital, ácido flufenámico, etc. sufren un ciclo tanto portal como extraportal. (119)

El ciclo enterohepático puede alterarse por múltiples factores:

#### I. FARMACOS:

El pentotal puede inducir las enzimas del sistema microsomal hepático y producen hipertrofia del RE con incremento de síntesis de sales biliares. (136)

#### II. DIETA:

La dieta rica en fibra, en azúcares (110,137) o la dieta para enfermos arterioscleróticos con abundante número de grasas poliinsaturadas, elevan el colesterol en la bilis así como el uso del clofibrato en los mismos, (129, 138) y elevan el porcentaje de litiasis. (139, 140)

La fibra se cree que la hemicelulosa, celulosa o lignina tienen especial afinidad por las sales biliares y en especial por el ácido cólico pudiendo repercutir su ingesta sobre la composición de la bilis. (117)

Además de la dieta se ha involucrado a la raza por la diferente frecuencia y composición de la litiasis según las razas. (118,139) Los masai africanos no hacen cálculos de colesterol debido a que poseen una baja proporción del mismo en la bilis (188) mientras que las mujeres indias de Norteamérica tienen una alta proporción de colesterol (141,142). Así pues existe una clara correlación entre la composición de la bilis y la composición de

los cálculos en las diferentes poblaciones. (139,140,141,142)

En Finlandia y Suecia también tienen bilis sobresaturada aún sin cálculos y la incidencia es de más de 50% a los 60 años.

El ayuno prolongado y los enfermos con nutrición parenteral intravenosa también tienen predisposición a la litiasis (143) por estancamiento de la bilis en la VB y afectación del ciclo enterohepático por falta del estímulo hormonal debido a la ingesta. La administración de lípidos intravenosos incrementa la saturación del colesterol y aparecen cristales de colesterol en la bilis hepática. (144)

### III. ENFERMEDADES HEPATICAS:

La hepatitis aguda viral tiene disminución del pool de sales debido a la masa celular hepática reducida por lo que tienen una síntesis también disminuida. (145,146)

En caso de ictericia obstructiva también se produce la interrupción del ciclo, con elevación de las pérdidas de sales biliares, (147,148) y además tienen efecto sobre el metabolismo lipídico hepático. (149)

### IV. ENFERMEDADES INTESTINALES:

En los padecimientos que provoquen disfunción de las bacterias intestinales se produce también una alteración del ciclo, pues las bacterias deconjugan las sales eliminando la taurina y glicina de las sales biliares conjugadas, por una 7-alfa-dehidroxilación de las sales biliares primarias (colato y quenodesoxicolato) produciendo deoxicolato y litocolato. También oxidan el grupo hidroxilo para producir ácidos biliares del tipo queto y la epimerización por transformación de su orientación espacial. Estos ácidos biliares secundarios son excretados por las heces. (119)

La absorción intestinal puede bloquearse por drogas (colestiramina o lignina) por proecipitación de las sales, o la neomicina por la destrucción de la flora. En el Síndrome de Malabsorción intestinal, síndrome del intestino corto, resecciones intestinales, by-pass o enfermedades del cólo (Crohn, celiaquía o esprue tropical) (119,150) también se elimina mayor cantidad de sales biliares por las heces.

## 2- BILIS LITOGÉNICA.-

### 2.1.- LA BILIS EN LA LITIASIS DE COLESTEROL.

Según SMALL los cálculos con alto contenido de colesterol pueden formarse por varios mecanismos:

a) Estudiando la bilis de VB con cálculos, BOUCHIER Y FRESTON (91,105) emitieron una teoría no confirmada en la práctica, (FIGURA Nº 11) basada en la FORMACION ANORMAL DE SALES BILIARES. Se encuentra un estado anormal de micelas por un aumento relativo de las sales dihidroxi respecto a las trihidroxi, lo que produce una disminución de la estabilidad micelar acompañada de descenso relativo de la relación sales biliares/ colesterol y comprometiendo así la solubilidad del colesterol. (113,151)

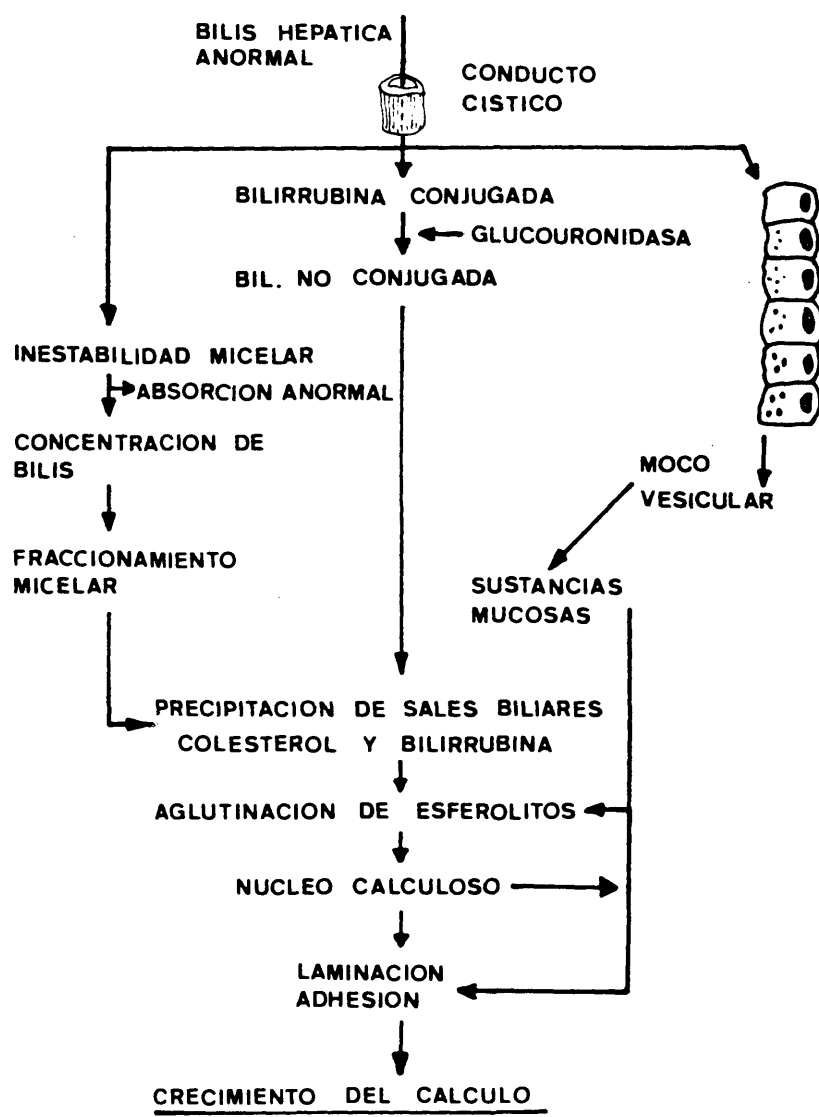
b) PERDIDA DE SALES BILIARES por la interrupción de la circulación entero-hepática y disminución del pool de las sales biliares. Puede producirse por enfermedades difusas como enteritis o quirúrgicamente por resecciones o shunts intestinales amplios.

La administración de colestiramina también interfiere la absorción de sales y produce cálculos de colesterol, hecho demostrado experimentalmente. (87)

c) FACTORES QUE ELEVAN EL CONTENIDO DE COLESTEROL EN BILIS como la existencia de una alteración del catabolismo del colesterol hacia las sales biliares por hipertrofia del RE liso (152) que produce dificultad en la hidroxilación del colesterol por lo que se altera la calidad de las sales biliares. Es la base de la teoría por la que muchos autores hacen responsable de la litiasis al hepatocito.

También la dieta rica en colesterol, mantiene constante su tasa debido a que se disminuye la síntesis endógena actuando a nivel de la conversión del ácido mevalónico. (153)

Otros autores por el contrario no encuentran alteraciones en el hepatoci-



**FIGURA Nº 11 .-** Hipótesis sobre el mecanismo de la litogénesis de BOUCHIER Y FRESTON. ( 91 )

to de un enfermo con litiasis vesicular, siendo practicamente normal.

d) La teoría emitida de WOMACK (105) sobre la nucleación y precipitación del colesterol por la EXISTENCIA DE MOCO en la bilis, que además de neutralizar la carga de la superficie de las micelas aumenta la viscosidad de la bilis y la inestabilidad, además de secuestrar las sales biliares, favoreciendo aún más la precipitación del colesterol. (91)

Según HOFFMAN y THISTLE (151) el orden de producción de los cálculos de colesterol es la aparición de una bilis sobresaturada, la agregación, el desarrollo y la formación de cristales que se hacen cálculos y que posteriormente pueden ocluir el cístico y provocar un ataque de colecistitis.

La disminución de la secreción de colesterol mediante la administración de ácido quenodesoxicólico va asociado a desaturación de la bilis y conlleva disolución de los cálculos por lo que se ha iniciado en 1960 la terapéutica en ese camino en los humanos (151) además de con ácido ursodesoxicólico. Se han encontrado buenos resultados en un 46% pero pueden volver a recidivar cuando se suspende la terapéutica, por lo que para prevenirlos se debería administrar durante un tiempo prolongado. (101,154)

En algunas ocasiones del día los pacientes con cálculos secretan bilis normal. (118)

La formación de los cálculos se produce en el balance de crecimiento del mismo durante los periodos de secreción de bilis anormal y el nivel de disolución del cálculo durante periodos de secreción biliar normal. En el caso del hidrops vesicular la bilis es blanca por falta de bilirrubina y tiene ácidos biliares, colesteroína y fosfolípidos en escasa cantidad. (55)

Comparando la bilis de pacientes con cálculos de colesterol y de pigmentos se ve que tiene bilis tanto vesicular como hepática normal e insaturada y ello protege contra la formación de cálculos de colesterol. Cuando el cálculo es mixto, con un núcleo pigmentario y el resto de colesterol, los trastornos serían los que condujesen a los pigmentarios y además una bilis saturada



capaz de precipitar el colesterol. El máximo interés centrado en la litiasis por colesterol se debe a que es constituyente principal de los cálculos en países occidentales, siendo el segundo componente de los cálculos en el resto de países, ya que comporta el 70% de peso del cálculo en el 70% de los pacientes. (112)

ADMIRAND y SMALL (115) utilizan para la valoración de la litogenicidad de la bilis un diagrama formado por la pirámide tetraédrica, relacionando se colesterol, lecitina, sales biliares y agua. Posteriormente (FIGURA Nº 10) llegaron a la conclusión de que el agua no era fundamental en la solubilidad del colesterol, y se toma el caso de la bilis con 90% de agua que es lo normal in vivo. Entonces el diagrama se transforma en un triángulo equilátero y sobre él se representan los porcentajes de los restantes componentes.

Con la variación de los porcentajes se pudo ver una zona en la que el colesterol estaba en solución o AREA MICELAR. Es una zona en la que proyectadas las cifras de los componentes, se producía la disolución del colesterol. Si por el contrario se proyectaba fuera de esa zona el colesterol se precipitaba en cristales por no poderse mantener solubilizado en las micelas de sales biliares y lecitina.

La bilis contiene una 80% de sales biliares en condiciones normales; 15% de lecitina y 5% de colesterol. ADMIRAND revisando el esquema añadió una zona metastable de modo periférico en la que se incluye la bilis sin cálculos pero con una alta incidencia o predisposición a la litiasis, ya que el colesterol se encuentra en forma de partículas en suspensión que si se deja reposar, se depositan. Este tipo de bilis junto a la de la zona micelar se denomina BILIS LITOGÉNICA.

Las modificaciones del pH no afectan al estado físico de las micelas hasta que no se llega a pH=4.5, en que los conjugados con la glicina tienden a precipitar. (115) Sin embargo en este tipo de estudios experimentales no se tienen en cuenta factores normales de la bilis tales como la bilirrubina, iones, triglicéridos, moco o proteínas.

La bilis vesicular de los sujetos con cálculos tienen también modificados

los microelementos, así como en los cálculos estudiándose este aspecto por análisis de activación de neutrones (155) y espectroscopia. Se ha encontrado mayor cantidad de calcio en los cálculos y en la bilis, además de fósforo, azufre, potasio, cobre, yodo y cesio, que en la bilis normal sugiriendo un papel en la formación de cálculos ya sea en cristales conglomerados o en combinación dentro de compuestos orgánicos. (155) Se ha observado así mismo elevación de la fosfatasa alcalina en la bilis (156) y de los triglicéridos, sobre todo si los cálculos son mixtos y no ocurre cuando son de colesterol.

El calcio parece que se une a las micelas y reduce su actividad. Por debajo de condiciones normales este complejo queda estable y soluble y no precipita. Cuando hay exceso de calcio puede producirse una falta de solubilidad y precipitar en forma de núcleo calculoso.

El exceso de Na y K podría disminuir el Ca unido por competición de locus en las micelas y favorecer la no solubilización. Se ha visto también cómo otros elementos elevan la velocidad de crecimiento de los cristales del Ca. Estos cristales podrían actuar formando agregados y dar un núcleo válido incluso para cálculos de pigmento. El Ca en bilis con cálculos de pigmento tiene niveles normales (157) y lo que sí existe es exceso de bilirrubina no conjugada. Esta reaccionaría con el calcio de la bilis y formaría un compuesto de bilirrubinato cálcico que es una sal insoluble.

Se ha evidenciado que existe una interacción entre la micela y el ión  $\text{Ca}^{++}$ . Los aniones de los ácidos biliares (taurocolato, etc) son tanto libres, como en su forma micelar potentes buffers por el calcio intraluminal. Este hecho es importante pues limita la concentración libre del calcio y puede jugar un papel en la reducción de la litogenicidad por la reducción de la precipitación del bilirrubinato, fosfato o carbonato de Ca en los cálculos pigmentarios y también en los cálculos de colesterol. (157)

## 2.2. LA BILIS EN LA LITIASIS PIGMENTARIA.

Se han practicado pocos estudios sobre la composición de la bilis en los casos de litiasis de tipo pigmentario o de cálculos compuestos principalmente por bilirrubinato cálcico. TROTMAN (158) en su estudio pudo obtener dos conclusiones tras el análisis de este tipo de bilis en pacientes americanos:

1ª.) La bilis de la litiasis pigmentaria contiene menos colesterol que la de los cálculos de colesterol, conteniendo cantidades similares de sales biliares, fosfolípidos, bilirrubina total y residuos sólidos.

2ª.) La relación entre el nivel lipídico de las sales biliares unido a los fosfolípidos respecto al colesterol en la bilis de estos pacientes era más alto que en la de los cálculos de colesterol y similares a valores normales. (159).

Estudios similares de composición practicados en pacientes japoneses (160) arrojan resultados similares, aunque puntualizando que la bilis contiene menos soluto en total que la bilis de cálculos de colesterol. De ello que la anormalidad de la litiasis pigmentaria no se crea debida a la sobresaturación de la bilis ni vesicular ni hepática. (160,161,162)

Dado que este tipo de litiasis se desarrolla en condiciones de hemólisis, se ha valorado que debería existir incremento en la concentración de bilirrubina en la bilis hepática, pero no se ha ratificado. Incluso es menor que en bilis normales e igual o mayor que en la bilis de cálculos de colesterol. (141,158,163)

La bilirrubina no conjugada existe en la bilis normal en cantidades de 0.5-15% con una cifra media de 1%. Esta cifra se ha visto incrementada en la bilis de VB con cálculos de este tipo y en pacientes con hemólisis. (161,164)

La bilirrubina se encuentra asociada a un complejo macromolecular de lípidos biliares (77,165,166) que hacen soluble también a la bilirrubina no conjugada. Esta solubilidad aumenta con el pH desde 6.2 a 7.8 y el pK de la bilis de 7.9, sugiriendo que el anión bilirrubina interacciona más pronto con las

sales biliares que lo hace con la forma protonada. (167) Se mantiene una relación 1:1000 de la bilirrubina no conjugada con las sales biliares, basada en una interacción micelar. (161)

La relación entre bilirrubina y fosfolípidos sobretodo con la lecitina no es bien conocida igual que la de la bilirrubina con el ácido diglucourónico. No se sabe si son los fosfolípidos o la bilirrubina no conjugada las que participan en la solubilización de la bilirrubina por las sales biliares en forma micelar o no.

El componente de los cálculos de bilirrubinato cálcico, se debe a las precipitación de las sales de Ca con la bilirrubina no conjugada. Se podría producir por la elevación del Ca con complejoado o iónico pero no se ha evidenciado esta elevación ni del Ca ionizado ni del total en la VB, salvo que exista inflamación de la misma o alteración de su función. (163,168,169,170)

La disminución del pH producido en la concentración de la bilis, podría decrecer la solubilidad de la bilirrubina no conjugada y del mismo bilirrubinato cálcico, pero éste pH es normal en la bilis de los cálculos pigmentarios salvo en casos de inflamación aguda con obstrucción o hipofunción en que el pH sí es inferior al normal. En teoría tras la secreción del bicarbonato producida por la secretina, podría elevarse el pH y aumentar la solubilidad. (170,171)

En condiciones de infección bacteriana de la bilis, se ha observado una mayor producción de bilirrubina no conjugada debido a la hidrólisis de la conjugada por la acción de la enzima beta-glucouronidasa de los gérmenes. (172,173) Esta enzima no existe en bilis estéril de VB acalculosas con colecistitis pero sí en las calculosas. El pH adecuado para la actividad enzimática es de 5.0, típico del hígado de mamíferos y existente en la bilis de cálculos de colesterol, mientras que en la bilis de los cálculos pigmentarios es de más de 6.5, típico de las enzimas bacterianas. (174) Añadiendo beta-glucouronidasa a la bilis de cálculos pigmentarios infectada o a la bilis normal se consigue precipitar el bilirrubinato cálcico. (174)

Sin embargo existen varios problemas en esta teoría. El que en USA

el 27% de los cálculos son de tipo pigmentario pero sus bilis son estériles. Una explicación podría ser la formación de este tipo de litiasis por otra vía que fuera la hidrólisis y no la infección o la inflamación. Esta hidrólisis se desarrollaría en la superficie del epitelio vesicular donde la enzima se concentra, y por ello no puede detectarse por incubación de la bilis. Esta serie de hallazgos diferentes en pacientes americanos y japoneses hace pensar en la etiología probablemente diferente. (161,172)

Respecto a la solubilización del colesterol por las sales biliares por la formación de micelas, se ha estudiado ampliamente, pero no se conoce su relación con los cálculos pigmentarios. En ciertos estudios se ha evidenciado una disminución de la relación de sales biliares dihidroxi/trihidroxi y el de glicina/taurina, pero otros muestran una completa normalidad del pool de sales biliares en los pacientes con cálculos pigmentarios. (160,161,175)

El papel de los cationes divalentes como el Ca o Mg es importante, dado que están presentes a gran escala en los cálculos pigmentarios pero su explicación aún no ha sido revelada. (168,176)

III.- LITIASIS VESICULAR.

#### 1.- RECUERDO HISTORICO.-

La existencia de concrecciones en la VB ha sido descrita por primera vez en una momia de la 21 dinastía en el Valle del Nilo (1000 años a.de J.C.) por RUFFER, citado por WOMACK (107) y por ELLIOT SMITH. Tras esta primera reseña histórica se originaron descripciones como las de Alejandro de Tales hacia el año 500 a. de J.C. en que se hace referencia a cálculos en sus escritos, (112) o la de Alexander de Traue (177).

Desde entonces y hacia el siglo XIV-XV comienza una era llena de descripciones por el inicio de la práctica de autopsias, aunque no es hasta el siglo XIX cuando se publican estos hallazgos por HOPPE Y SYLEN en un tratado de Medicina.

Las teorías sobre la formación de los cálculos en la VB se han ido elaborando a lo largo del tiempo. GALENO tenía la idea de que el aumento de la viscosidad de la bilis y del moco con elevación de la temperatura del cuerpo son el origen de los mismos. Esta teoría perduró hasta entrado el siglo XVI.

PARACELSO no estaba de acuerdo y emitió la doctrina del TARTARO publicada en 1563 donde expresa la idea de que los cálculos del organismo se formaban como los precipitados calcáreos del vino y los consideraba como material impuro que se formaban a partir de algunos constituyentes del cuerpo. Creía que al bilis se coagulaba en este tártaro y aludía tanto a factores alimenticios como drogas.

TERNELIUS en 1558 en su obra "DE MORBIS UNIVERSALIS Y PARTICULARIBUM" emite otra hipótesis de estasis bilisr como causa de los cálculos.

MAJOR también hace un estudio bibliográfico completo sobre el tema (178,179) y BEZOLD en 1725 en su obra "DE CHOLELITHIS" (112) apoya la teoría del éstasis.

El 1796 es descrita por FR. AUGUST WALTER en Alemania , citado por WOMACK (107), una colección de cálculos pero la importancia de sus componentes comienza en 1733 cuando se describe que la bilis contenía una sustancia grasa soluble en alcohol y trementina. Fue en el siglo XIX cuando se produjo el aislamiento del colesterol como principal componente. FRERICHS describe en "A CLINICAL TREATISE ON DISEASES OF THE LIVER" de modo conciso todo lo sabido hasta entonces sobre la composición de los cálculos. (180)

En 1856 MECKEL VON HERSBACH en su libro "MICROGEOLOGY VE BER DIE CONCREMENTE IN THIERISCHEM ORGANISM" dice que "todos los cálculos verdaderos tienen su base en la presencia de moco patológico" y que "la presencia de una condición catártica, que produce ese moco es prerequisite esencial de la litopoyesis." Para este autor la condición catártica es la INFECCION. (112,181)

HENRSBACH (182) sugiere junto a MONTGOMERY en 1866 y ORD en 1879 (183) que el estasis en la VB permitiría formar unos esferolitos de pigmento biliar que se agregan y proporcionan un núcleo para la agregación y formación del cálculo (93,184) RAINS (185) aporta la idea de la estratificación de la bilis según las diferencias de peso específico, lo que facilita la precipitación.

El estasis además facilita la ascensión de bacterias del intestino y su actuación o bien la reproducción de las bacterias existentes en la misma bilis, según la idea de BIEDEL Y KLAUS (186) o bien pueden acudir por dispersión hematógica como sugirieron EXNER y HEYROWSKY en 1907, alegando la descomposición de los ácidos biliares por los gérmenes, lo que haría menos soluble a la colesteroína y al cristalizar iniciaría un cálculo. En 1890 WELCHE aísla el *Esterichia Coli* y el *Bacilus Típhi* en los cálculos y GILBERT y FOURNIER en 1897 logran desencadenar la producción de cálculos inyectando en la VB cultivos de *B. Típhi* atenuados. (112)

THUDICHUM en 1862 por citación de JUNNIPER (187) emite la hipótesis de que las alteraciones de la concentración de las sales biliares en la



bilis es la causa de la litiasis. Sin embargo hace la diferenciación entre la simple precipitación de esas sustancias y la verdadera formación de un cálculo. Sospecha la existencia de una matriz proteica que haría de nido de los cálculos lo que es admitido por BUDD en 1853 (112,188) pero no consigue desarrollar la idea totalmente. Describe una clasificación de los tipos de cálculos según la forma, que fue modificada posteriormente por NAUNYN (189) profesor en Estrasburgo.

Este autor los clasifica según la composición química en colesterol puro, colesterol en láminas, comunes afacetados, mixtos de bilirrubinato cálcico y formas raras. En 1892 ( 94) postula que los cálculos se deben a la inflamación de la VB resultante de una descamación de células y producción de sustancias anómalas que se invaden por el colesterol en un proceso denominado COLESTERINIZACION. (186,190)

Otros autores opinan que dicha inflamación producía la exfoliación de las células y la aparición de una proteína anormal creando un medio en el que puede precipitar el cálculo. (93)

Al mismo tiempo THUDICHUM (191), BOSEN (192) y ROUSING (193) desafían la tesis de NAUNYN y sugieren que primero se formarían cálculos pigmentarios en los canalículos intrahepáticos debido a una enfermedad del hígado y que el colesterol se apone en capas después cuando el cálculo llega a la VB.

Otro concepto asociado a la teoría de NAUNYN fue relativo a las propiedades físico-químicas de la bilis, de modo que en la VB normal se mostró que no había secreción de colesterol y se sugirió que eran las células epiteliales descamadas la fuente del mismo. Al mismo tiempo se valoró la reabsorción de los ácidos biliares en la VB patológica por pensar que aumentaba el contenido de colesterol y disminuía la posibilidad de mantenerlo en solución. (194) Posteriormente ha sido apoyado por METZGER en 1926. (186)

En estudios experimentales ANDREWS y SHEENHEIMER (195) observaron que la VB normal absorbe agua y sales biliares, pero la VB patológica absorbe ácidos biliares pero no colesterol acumulándose en la bilis. Además se descubre la importancia de los fosfolípidos como mantenedores en solución del colesterol, aspecto estudiado posteriormente por JONSTON en 1939 (196) e ISAKSSON en 1954. (116)

El factor infeccioso se comenzó a valorar de modo que NAUNYN en 1921 le incluye como causante de la amalgama de sustancias que comportan proteínas, bilirrubina e incluso las mismas bacterias y que sumadas al epitelio degenerado y exfoliado, forma una masa lipídica rica en colesterol que es altamente refractaria y formaría el inicio de un cálculo. Proporcionaría el núcleo sobre el que el colesterol cristalizaría en cálculos de colesterol simples y tras la fusión de varios se transformaría en cálculos laminados. En otras ocasiones se mezclarían grasa, bilirrubinato cálcico, sales biliares alcalinas, moco, etc. (112) originando masas sedimentarias sobre las que se apone bilirrubinato cálcico en una capa y originaría el cálculo verdadero. (197)

ASCHOFF (107) opina que la elevación del colesterol en la bilis con exceso de solventes es lo que hace precipitar al colesterol y originar cálculos, pero no puede demostrar capacidad secretora de colesterol en el epitelio de la VB.

Considera que la patogenia de los cálculos mixtos es distinta a la de los de colesterol, y que la oclusión del cístico junto a la inflamación de la VB y descamación de las proteínas de la mucosa son los factores desencadenantes aportando el núcleo para originar los cálculos.

Esta conclusión es fruto del hecho experimental de la disolución de los cálculos con éter o cloroformo, manteniéndose el entramado proteico residual.

Los cálculos formados por colesterol y pigmento cálcico se originan cuando el medio era rico en proteína pero los de colesterol puro no poseían el entramado proteico y se formaban en un medio pobre en proteínas.

ASCHOFF hizo también la descripción de un tercer tipo de cálculo debido a padecimientos de tipo infeccioso o metabólico, a los que se denominó CALCULOS ESTASICOS. Se originan en los conductos biliares o colédoco y eran de textura blanda, frágiles, laminados y que generalmente se produce sobre un cuerpo extraño que se pensaba era un pequeño cálculo de la VB.

MEYER y MOENKE (107) clasificaron los cálculos en 26 variedades

según el contenido de colesterol, bilirrubina y los complejos de calcio identificados como carbonatos, apatita y otros que pueden mezclarse en diferentes proporciones entre sí, de modo que no sólo cambia de cálculo a cálculo si no también dentro de partes de uno mismo.

A mediados de 1950 se comenzó el estudio de la composición de la bilis tanto en animales experimentales como en humanos, evidenciándose un exceso de colesterol o un déficit de sus disolventes las sales biliares.

En Japón se ha estudiado el tipo de cálculos cuya composición es mayoritaria en esa zona. Son los de bilirrubinato cálcico y al contrario que en países europeos o en USA, y se llegó a la conclusión de que las infecciones por E. Coli e incluso parasitosis eran un factor fundamental en su patogenia. La E. Coli segrega una enzima o beta-glucouronidasa que es capaz de hidrolizar el glucourónido de bilirubina a bilirrubina libre que precipita posteriormente en forma de concrecciones calculosas. (91,97,198)

Todos estos factores han sido analizados y estudiados más recientemente por varios autores, llegando a hipótesis patogénicas distintas. Una de las más importantes es la referente a la solubilidad del colesterol y la producción de cálculos en el momento en que se considera sobresaturada la bilis (ADMI-RAND Y SMALL) (115) aún tenida como básica en la litogénesis.

SWELL y cols. en 1974 consideraron a la colelitiasis como una enfermedad del hígado que se caracteriza por un defecto en el mecanismo de síntesis y/o del transporte de los lípidos biliares. Visto así, la litiasis sería el estadio final de un proceso que se inicia con un defecto metabólico o genético (199) que lleva a producir una bilis hepática sobresaturada. Se ha sugerido que podría ser por déficit de una enzima limitante de la conversión del colesterol a ácidos biliares. (200) Se valoran otros factores como la alteración de la circulación enterohepática que conduciría a una composición anormal de la bilis. (119,121)

SHAFFER y SMALL en 1976 (201) proponen que existen 6 tipos de anomalías fisiopatológicas que podrían conducir a la formación de cálculos:

- TIPO I:

Excesiva pérdida de sales biliares por ileostomía, enfermedad ileal, etc. No pueden compensarse las pérdidas por la síntesis y se produce bilis saturada en colesterol.

- TIPO II:

Existe una hipersensibilidad del feed-back de los ácidos biliares no respondiendo con la producción a las pérdidas normales produciéndose una disminución del pool y de su cuantía en general. Este hecho se da en individuos de raza caucásica.

- TIPO III:

En ellos la bilis está hipersaturada por tener una secreción elevada. Ocurre en obesidad, rápida pérdida de peso, dieta, uso de clofibrato, etc.

- TIPO IV:

Se combinan los tipos II y III, encontrándose en los indios americanos y caucásicos.

- TIPO V:

Presentan una circulación enterohepática rápida de las sales biliares con una disminución del tamaño del pool de los mismos.

- TIPO VI:

En enfermedades propias de la VB, conductos biliares o del esfínter de Oddi.

SMALL así mismo, y previo al establecimiento de estas 6 categorías opina que existen 5 etapas en la formación de cálculos sintomáticos siendo cada una prerrequisito para la siguiente. Se ha demostrado esta serie en estudios sobre los indios PIMA (64,65). Son:

1ª) ESTADO METABOLICO Y GENETICO: con anormalidades o predisposición genética que llevan a una producción de bilis sobresaturada, que no se mani-

fiesta.

2º) ESTADO QUIMICO: la bilis ya sobresaturada de colesterol puede objetivarse y diagnosticarse por la medida de la composición química de la bilis y el cálculo de la saturación del colesterol.

3º) ESTADO FISICO: la bilis sobresaturada tiene una nucleación y se inicia el crecimiento de unos cristales de monohidrato de colesterol. En la bilis fresca de sujetos en los que aún no existen cálculos se han hallado cristales macroscópicos de colesterol monohidrato.

4º) ESTADO DE CALCULOS MICROSCOPICOS: existen ya cálculos microscópicos debido al crecimiento y aglomeración de los cristales.

5º) ESTADO DE CALCULOS MACROSCOPICOS: cuando se aglomeran los cálculos microscópicos y crecen, produciendo clínica de colecistitis o bloqueo de los conductos biliares.

De este modo se ha llegado al estado actual del conocimiento de la litogénesis, en base al cual se ha iniciado el resto del estudio sobre los cálculos y el proceso litogenético.

## 2.- FACTORES GENERALES INFLUYENTES.- =====

Los diversos factores influyentes en la formación de los distintos tipos de cálculos que se van a analizar son:

### 2.1. FRECUENCIA.-

En USA el 10-20% de la población adulta sufre de la patología de la colelitiasis, aunque el 30% de las personas con cálculos no presentan síntomas a lo largo de la vida. (204)

USOBIAGA (112) encuentra litiasis en el 2.96% de un total de 22.900 historias clínicas revisadas, siendo un nivel similar al de otros autores, aunque asciende en la realización de necropsias al 11.2%.

La litiasis pigmentaria comporta el 10% del total de la litiasis en USA (205) y del 20-30% en otros países (40,161). En los cirróticos o cuando los cálculos son intrahepáticos la litiasis es pigmentaria en la mayoría. (162) Esta frecuencia asciende en zonas orientales y así en Iraq es del 24% y en Japón del 70% sobretodo en las áreas rurales.

### 2.2. EDAD.-

La máxima incidencia se encuentra en la 6ª-7ª décadas de la vida aumentando desde la 1ª-2ª a la 9ª en que el 20-30% de la población lo padece. (20,100,161)

### 2.3. RAZA.-

Los cálculos de colesterol tienen una incidencia tope en los indios de

raza PIMA americanos en que el 70% de las mujeres a los 30 años lo poseían y el 80% a los 50 años junto al 70% de los hombres a esa edad.

La tribu MASAI africana sin embargo no lo padece nunca. De ello que se hayan valorado factores raciales y genéticos (112) además de afectarse menos en la raza negra que en la blanca.

La litiasis pigmentaria es sin embargo muy rara en indios americanos (206) encontrándose más susceptibilidad en los hombres negros aunque esto no se ha demostrado. (207)

#### 2.4. SEXO.-

La población más afectada por la litiasis por colesterol es la conocida en inglés como la de las "4 F"(FEMALES, FAT, FERTIL, FORTY) Es decir, mujer, obesa, múltipara y cuarentona.

La relación hombre/mujer es de 4/1 predominando las mujeres y edades más precoces que en los hombres. (93) Por encima de los 60 años la frecuencia se equipara y después se incrementa de nuevo si la mujer es obesa y múltipara. (100)

En la década de 20 a 29 años se presenta en el 40% y en el hombre en 1-2% mientras que de 40 a 49 años asciende a 13% y 5% respectivamente en mujer y hombre. Ya en los 70 a 79 años es del 34% y 18%. (112)

En la litiasis pigmentaria no se ha visto ninguna relación con el sexo ni la paridad estando afectados similarmente ambos sexos.

#### 2.5. HORMONAS SEXUALES.-

Se han implicado las hormonas femeninas como favorecedoras de la

litiasis de colesterol en las mujeres, sobretodo en las multíparas más que en nulíparas por lo que también se relacionan paridad y enfermedad calculosa. (208)

La toma de anticonceptivos en mujeres jóvenes menores de 25 años (100) y la de estrógenos en mujeres menopaúsicas o varones (209) eleva la incidencia, así como la paridad numerosa o el embarazo en edad superior a los 29 años (210) atribuyéndose a la mayor secrección de colesterol (100) y a una disminuida de ácidos biliares por descenso de la circulación enterohepática, aunque se incrementa el pool de ácidos biliares sobre todo el ácido cólico. Estos factores también elevan la saturación del colesterol en la bilis por lo que se duplica el riesgo de padecimiento de litiasis.

Se ha implicado también a la afectación de la motilidad de la VB por las hormonas femeninas al igual que afecta el músculo uterino estando en el 75% atónica y distendida. (93)

Existe mayor incidencia en la mujer multípara premenopáusica que en la nulípara pero tras la menopausia se reduce esa diferencia. (102) Antes de los 25 años no se han demostrado diferencias de incidencia entre las consumidoras o no de contraceptivos, pues su efecto no se nota hasta 20 años después y por encima de los 40 de edad. (212)

En las mujeres jóvenes con periodos interdigestivos largos se producen más colelitiasis, no habiendo esa diferencia en edades maduras. Se atribuye este hecho a la mayor saturación del colesterol en la bilis humana tanto en la VB como hepática tras 16 horas de la ingesta. (213)

## 2.6. DIETA.-

La diferencia clara entre el tipo de litiasis en Occidente y en Oriente implica una influencia de los hábitos dietéticos y alimentarios. Así la dieta rica en colesterol (129,213) y la pobre en fibra o rica en azúcares refinados



como la sucrosa (124) favorece la litiasis de colesterol en países desarrollados del área occidental.

Cuando estas sustancias se ingieren de modo excesivo se produce una sobrealimentación y obesidad con riesgo de litiasis, aunque su ingesta con normalidad no altera la composición lipídica de la bilis ni la secrección de colesterol. Una dieta que favorece la obesidad hace a la bilis sobresaturada de colesterol por absorción excesiva y secrección aumentada a la bilis. (215)

Dos terceras partes de los casos de litiasis en Japón sin embargo son de tipo pigmentario pero al ir adoptando dieta y fórmulas sociales occidentales se ha ido disminuyendo este tipo elevándose los de colesterol. No se han visto relaciones entre obesidad y cálculos pigmentarios. (161) De modo experimental se ha visto que una dieta rica en grasas produce un 5% de litiasis pigmentaria y si contiene gran proporción de grasas poliinsaturadas se producen en un 40-100% de los hamsters. (216)

## 2.7. LOCALIZACION DE LOS CALCULOS.-

Mientras que los cálculos de colesterol se encuentran en la VB genraimente, los pigmentarios están en el 80-90% en la VB pero además en un 20% se asocian a cálculos en la vía bilir o intrahepáticos. (161,217)

En Tailandia la colelitiasis constituye el 59.6% de la patología biliar y en el 68.8% es coledocolitiasis y un 15.6% de cálculos intrahepáticos. (218, 219)

## 2.8. ENFERMEDADES ASOCIADAS.-

Se ha encontrado una relación entre la litiasis y otras patologías de modo que se encuentran asociadas en varias ocasiones:

#### 2.8.1. OBESIDAD, DIABETES MELLITUS, HIPERCOLESTEROLEMIA, HIPOTIROIDISMO, NEFROSIS:

Se produce litiasis por colesterol debido a la elevación de la cifra del mismo que se produce en estas enfermedades con la consiguiente elevación de la incidencia. (186)

La dieta rica en carbohidratos y pobre en proteínas con una mala regulación de los hidratos de carbono como en la diabetes puede también involucrarse.

#### 2.8.2. HIPERPARATIROIDISMO:

Se ha visto una frecuencia por encima de la media de 20-30% de cálculos pigmentarios aunque no se ha corroborado por todos los autores. (220,221) Podrían incriminarse anomalías del metabolismo hepato-biliar del calcio. (161)

#### 2.8.3. ANEMIA PERNICIOSA, HEMOLITICA o HEMOLISIS:

En este tipo de anemias o en la hemólisis causada por válvulas cardíacas y otros factores (222,223), la incidencia de litiasis de tipo pigmentario es también elevada. (198)

Aunque también se relaciona con la cirrosis la mayoría de los casos con cálculos pigmentarios no son cirróticos ni tienen hemólisis. (162)

En la anemia de Minkowski-Cauffard se dan en el 45-70% de los casos; en el 7-50% de las drepanocitosis (224) y en el 13-25% de la talasemia mayor. (225,226)

#### 2.8.4. HIPOVITAMINOSIS A:

Provoca una hiperplasia de las células mucosas de algunos epitelios (227) con hiperproducción de moco que habitualmente tiene funciones de lubri-

cación de la mucosa, impermeabilización y acción antibacteriana, viral o parasitaria. (95)

#### 2.8.5. ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y PARASITARIAS:

En los países orientales se asocia la litiasis pigmentaria con la malaria, paludismo y las parasitosis por *ascaris lumbricoides* en Japón y Vietnam del Norte fundamentalmente. (161,164) La clonorquiasis se asocia en Hong-Kong y Singapur. (198,228,229)

#### 2.8.6. DILATACION DE LAS VIAS BILIARES INTRA Y EXTRAHEPATICAS:

A menudo son estenosis benignas o inflamatorias postoperatorias. Se responsabiliza de los cálculos y de la fibrosis al estasis y la infección, favorecido a veces por cuerpos extraños.

En Singapur se ha asociado al consumo de opiáceos, debido al espasmo que produce en el esfínter de Oddi que podría conducir a una dilatación supraesfinteriana. (230)

Se ha visto también relacionado con la enfermedad de Caroli (231) por el estasis de la bilis a nivel intrahepático que produce por sus dilataciones o ectasias.

#### 2.8.7. CIRROSIS HEPATICA:

La asociación de cirrosis hepática y litiasis es muy común dándose de 2 a 3 veces más que en condiciones normales y con una frecuencia del 20-27% (232) aunque otros estudios no corroboran estos hallazgos encontrándolo en sólo el 4%. (233) Puede llegar al 30.6% en ocasiones frente al 16% del resto de la población. Los cálculos de tipo pigmentario son 6 veces más comunes (130) siendo de consistencia blanda y de pequeño tamaño semejante al

barro biliar. En estos casos se afectan tanto los hombres como las mujeres. En algunos estudios se ha evidenciado que estos cálculos contienen mayor cantidad de carbonato cálcico ( $\text{CO}_3\text{Ca}$ ) en los cirróticos (234) y que si no lo contienen la cantidad de bilirrubinato es mayor. (235)

No se conoce bien el mecanismo de formación de los cálculos en los cirróticos ya que la composición de la bilis tomada en el duodeno es similar a la de sujetos normales, observándose que no sólo no está elevada la bilirrubina no conjugada sino que en los cirróticos está disminuida. (161) Existen diferentes argumentos para explicar esta mayor incidencia:

- alteraciones cualitativas y cuantitativas de la síntesis de los ácidos biliares de estos enfermos hepáticos.
- la presencia de un aumento de la reabsorción de ácidos biliares en la sangre por disminución de la depuración por el fallo hepático.
- aumento del flujo de ácidos biliares desde la bilis a la sangre por la destrucción hepatocelular.
- hemólisis moderada por un estado de hiperesplenismo que se asocia en estos enfermos. (234,236)
- el reposo excesivo con estasis vesicular y una concentración excesiva de estrógenos circulantes que se sabe concentran al colesterol en el hígado, y disminuyen la síntesis y secreción de los ácidos biliares. (236)
- un factor alimentario asociado con excesiva cantidad de carbohidratos, falta de fibra y proteínas y mala regulación de los hidratos de carbono.

#### 2.8.8. PANCREATITIS Y RESECCIONES DE ILEON TERMINAL:

La alteración que comportan en la composición de la bilis al trastornar el ciclo enterohepático, dan el doble de frecuencia de litiasis y el 90% de tipo pigmentario. (236)

#### 2.8.9. CANCER DE COLON Y RECTO:

Su asociación se explica por la dieta rica en colesterol y deficitaria de ácidos biliares y fibra que también provoca las neoplasias del intestino grueso. (237)

#### 2.8.10. CANCER DE ESTOMAGO:

En los indios PIMA americanos se ha encontrado una elevada frecuencia de cálculos en la VB asociándose a carcinoma gástrico en un porcentaje mayor de lo esperado respecto al nivel de incidencia normal. (237,238)

#### 2.8.11. CANCER DE UTERO:

En un estudio practicado en 15 países se ha hallado una relación significativa entre la presencia de cálculos y la aparición de una neoplasia uterina. (237)

#### 2.8.12. FARMACOS:

La neomicina disminuye el colesterol en el suero y la cortisona oral previene la formación de cálculos de colesterol y hace que en el 100% sean pigmentarios. (216) La mejoría de la saturación en colesterol no conduce a la formación de cálculos pigmentarios relacionándose pues de modo íntimo con los ácidos grasos insaturados.

#### 2.8.13. VAGOTOMIA QUIRURGICA:

Mientras la vagotomía desencadena la producción de cálculos de colesterol por modificaciones en el vaciamiento de la VB, la estimulación crónica de los vagos sobre todo el derecho más que el izquierdo induce cambios en

la bilis de los perros y se forman cálculos pigmentarios. tras vagotomía no se ha visto litiasis de este tipo. (239)

## 2.9. CALCULOS Y CARCINOMA DE VB.-

Aunque se discute sobre la relación exacta, sí se ha visto una asociación entre la presencia de cálculos y la aparición de cáncer de VB.(39,91)

El Ca de VB es el 3-4% de las neoplasias y la 5ª más común del tracto gastrointestinal. (240) Aparece en el 1-2% de los pacientes calculosos siendo el 0.0001 de la incidencia anual cuando los cálculos son silentes. El 76-87% de los pacientes con Ca tienen cálculos y el riesgo de malignización en pacientes con cálculos no tratados durante 20 años es de 0.2-0.5%. El 88% corresponde a mujeres siendo un porcentaje similar al de la colelitiasis (240) y manteniendo un mayor riesgo el tipo de VB en porcelana con un 11% de Ca. (241,242)

Su incidencia se eleva con la edad. El 0.3% se presenta en menores de 50 años, el 3.8% entre 50-65 años y el 8.8% si superan los 65 años.

También se ha observado una correlación entre el tamaño del cálculo y el Ca. Si el cálculo es de más de 3 cm. de diámetro el riesgo de neoplasia se eleva 10 veces (243). Este hecho no se ha conseguido demostrar clínicamente. El cálculo podría producir la displasia epitelial que acaba en carcinoma y ello es más fácil en cálculos de gran tamaño que en los pequeños pudiendo este factor quizá reflejar la duración de la enfermedad. En el 13.5% de las VB con cálculos se encuentra hiperplasia atípica y en el 3.5% Ca de tipo in situ. (242)

El factor químico cancerígeno del metilcolantreno también se tiene en cuenta y se encuentra en la bilis.

No hay correlación demostrada entre la adenomiomatosis de la VB

y los cálculos y la malignización de la primera siendo su asociación muy rara. La coexistencia entre cálculos y adenomas sin embargo se da en el 50% de los casos. (244,245,246)

### 3.- ESTRUCTURA DEL CALCULO.-

Tras la fragmentación o la sección del cálculo y la visión directa se pueden distinguir en el cálculo mixto o de colesterol 3 partes bien diferenciadas: un núcleo central, un cuerpo con sucesivas capas debidas al desarrollo del cálculo por aposición de sustancias y la tercera, la corteza. El núcleo correspondería al germen o inicio de la cristalización; el cuerpo a la etapa del desarrollo y la corteza a la detención de su crecimiento. Mediante estudios con microscopio de luz polarizada se observan las mismas capas aunque de modo más detallado.

#### 1.- NUCLEO.-

Se compone de pigmento oscuro, material fibroso y colesterol. El colesterol se cristaliza en forma de microcristales de 0.1 micras hasta cristales tabulares de 3-4 mm. que se van aponiendo sucesivamente dando agregados.

Con la luz normal son transparentes y se colocan oblicuamente de forma radial desde el núcleo dando forma de plumas, espigas o abanicos. Cuando el cálculo tiene varios núcleos los radios se enlazan formando haces de colesterol, con un deficiente grado de ordenamiento. (247) Cuando en ocasiones estos cristales se tiñen de pigmento se colorean en amarillo.

Presenta una ordenación laminar interrumpida por la intercalación de

agrupados constituidos por cristales convergentes soldados lateralmente y que dan la forma de espiga observada con la luz polarizada.

Cortando el cálculo en el plano sagital los cristales de colesterol aparecen como agujas que emergen desde la zona inferior. (248) Estos cristales de colesterol pertenecen cristalográficamente al sistema triclinico cuando el colesterol monohidrato y tiene la forma de un prisma rectangular oblicuo con los vértices truncados (FIGURA N° 12-A) siendo sus características cristalográficas:  $a=12.39 \text{ \AA}$ ;  $b=12.41 \text{ \AA}$ ;  $c=34.36 \text{ \AA}$  y los ángulos  $\alpha=91.9^\circ$ ;  $\beta=95.1^\circ$  y  $\gamma=100.8^\circ$ .

En el 85-87% el núcleo se compone de pigmento añadiéndose fosfato de calcio en 64% como material poroso y escamoso además del colesterol. (250)

El color del cálculo en el núcleo es más oscuro por la concentración del pigmento en la zona central del oolito y la dispersión del color hacia los bordes.

## II.- CUERPO.-

Se compone de los cristales de colesterol radiales entre los que se coloca material proteico formando como una red. Los cristales del colesterol se consideran las unidades básicas en la morfología de los cálculos y sobre ellos se colocan el resto de los componentes cuidando una relación espacial y también una interacción entre ellos lo que condiciona en ocasiones el crecimiento de los cristales de colesterol.

El pigmento en forma de bilirrubinato cálcico se deposita alternando con los cristales de colesterol y es el segundo componente más importante de los cálculos mixtos y de colesterol y el primero de los pigmentarios. Su coloración oscila desde el amarillo, marrón, rojizo, verde hasta el negro. Este color varía según la concentración del producto, el espesor del depósito



y su afinidad química por las proteínas, mucopolisacáridos y otras sustancias, siendo su unión muy intensa con la albúmina. (251)

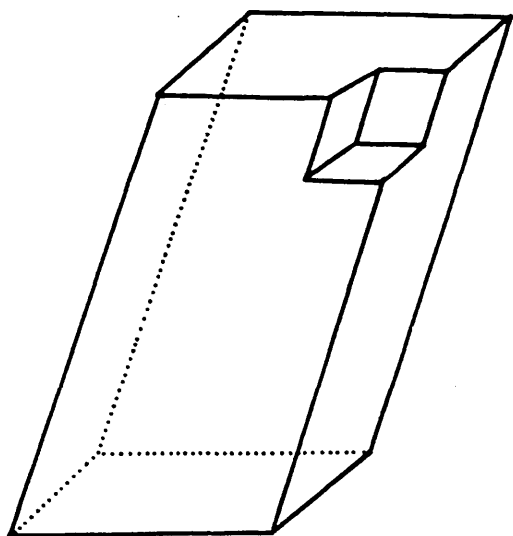
Este pigmento se dispersa cubriendo la superficie del colesterol sin penetrar en su estructura cristalina, dando un tono amarillo claro. Otras veces se concentran en espacios intercristalinos donde aparentemente se detiene el crecimiento del colesterol entre los haces y es de color rojo-marrón. o forman anillo o capas concéntricas más numerosas conforme se avanza hacia la superficie del cálculo tomando diferente gama de colores. Pueden alternar capas de colesterol y de pigmento indicando que cada una es una fase en el desarrollo del cálculo mixto. (252)

El crecimiento de los cálculos se debe a la trama o armazón sobre la que interaccionan, precipitan y son atrapados, tanto los componentes de los cálculos como las sales cálcicas, existiendo afinidades que hacen posible estas interacciones y el crecimiento por epitaxia de la concrección. (183, 247,253)

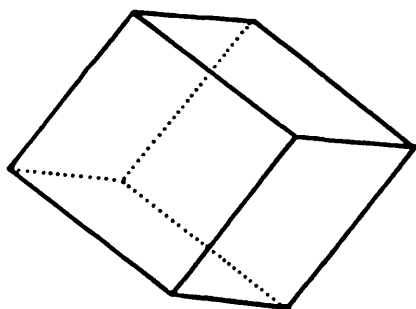
Exteriormente al núcleo se pueden observar acúmulos de 3 mm. de palmitato de calcio en forma de plumas (250) o cristales de carbonato cálcico cuya forma cristalográfica es bien distinta de la del colesterol, pues es de tipo romboédrico. (FIGURA Nº 12-B), encontrándose como apatita. También se incluyen proteínas.

El palmitato de calcio es el 5.9% de los componentes cristalinos del cálculo y el 3º más importante después del colesterol y  $\text{CO}_3\text{Ca}$ . Aparece en el 36% de los cálculos en forma de pequeñas perlas blancas en la zona del núcleo y cuerpo (254). Se cree que sólo se deposita en cálculos mixtos de combinación pero no en los afacetados múltiples. (255,256)

El  $\text{CO}_3\text{Ca}$  aparece en el 40% de los cálculos en pequeña cantidad siendo su forma de presentación más frecuente la vaterita y la menos el aragonito (257,258). Se encuentran dispersos en las 3 capas del cálculo y mezclado con el bilirrubinato de calcio aunque cada una de sus tres formas tiene una estructura y localización diferentes. (259) La vaterita se encuentra en el centro, la calcita puede estar en el cuerpo y la corteza y el aragonito



**A**



**B**

**FIGURA Nº 12.-** A) Cristal de colesterol, con forma de prisma rectangular oblicuo con vértice truncado.  
B) Cristal romboédrico de carbonato cálcico.

en la zona media y en escasa cantidad. (260)

### III.- CORTEZA.-

Contiene pigmento y colesterol formando el estrato final de la formación del cálculo.

Los cálculos pigmentarios puros no tienen forma, son de color oscuro casi negro y se producen por agregación de oolitos que se yuxtaponen rellenándose los huecos también por pigmento. Al ser una sustancia amorfa y no cristalina dan acúmulos sin forma aunque pueden ser redondeados en el centro del cálculo, tomando una coloración más clara en la perifería y más oscura en el área central. (248)

Los cálculos formados de manera primaria en el colédoco son compuestos de bilirrubinato cálcico sin ninguna estructuración ni laminación con una conformación amorfa. Si coexisten con cálculos de la VB se añade palmitato de calcio en su composición. (261)

## 4.- COMPOSICION DEL CALCULO.-

### 4.1. MÉTODOS DE ESTUDIO.-

Los nuevos métodos de estudio aplicados al análisis de los cálculos provienen de una aplicación del mismo a los minerales en general (262) pudiéndose acoplar todos los métodos y tecnologías que a ellos se aplican.

Entre ellas se encuentran:

1ª) INSPECCION VISUAL:

La inspección visual del tamaño, color, forma y estructura de conformación se correlaciona con métodos de laboratorio de tipo químico. (158)

2ª) MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA:

Mediante la sección transparente del mineral denominada como de LAMINA DELGADA y visualización al microscopio con distintos aditamentos a fin de poder determinar la composición cristalográfica del cálculo. (262) La asociación de nicols cruzados determina la composición cristalina y los caracteres geológicos del cálculo como índice de refracción, ángulo de ejes ópticos, etc. y ello es importante para reconocer el tipo de cristal y su origen. Estos aditamentos utilizados en óptica para determinar las direcciones de vibración de los índices de refracción se denominan COMPENSADORES.

Otro aditamento utilizado es la lámina de yeso o rojo de primer orden o la cuña de cuarzo, para modificar el haz de luz de modo que puede distinguirse la posición de los cristales según la coloración que obtienen. (262)

3ª) CROMATOGRAFIA:

La cromatografía de gases o de columna es un método útil para determinar por microanálisis cuantitativo los componentes del cálculo. (217)

4ª) ELECTROFORESIS:

Es utilizado también para la determinación bioquímica de los componentes. La electroforesis de geles se ha valorado la composición de las proteínas y el peso molecular (Pm). La más abundante es la albúmina, semejante en Pm a la del buey. Tiene gran afinidad por el colesterol y los pigmentos igual que la albúmina sérica (251) y ello apoya la idea de que la matriz del cálculo es de tipo proteico.

5ª) HISTOQUIMICOS:

Para valorar determinados componentes según grado de tinción con las diferentes técnicas (263) siendo muy variadas las utilizadas.

6\*) OPTICOS:

Suelen utilizarse con objeto de valorar las características cristalográficas del cálculo. (264)

7\*) RADIOGRAFICOS:

Para observar la estructura del cálculo y su disposición por métodos radiológicos. No se obtienen excesivos datos de estos estudios y solamente tienen interés a nivel morfológico. (87,225,265)

8\*) MICROSCOPIA DE SCANNING:

Se practica para estudio de la superficie de los cálculos y análisis del carbonato cálcico en concreto. (264) Se obtienen imágenes morfológicas interesantes en cuanto a estudio de la superficie del cálculo y su disposición, así como la de los cristales en el interior.

9\*) ESPECTROSCOPIA DE RAYOS INFRARROJOS:

No requiere ni la solubilización ni la cristalización de las sustancias a estudiar por lo que es un método ventajoso. (198)

Es útil en el estudio de los cálculos pigmentarios dado que al no poseer estructura cristalina no puede verse con otros métodos radiológicos. En ellos se han visto el pigmento, los cristales de carbonato y otros componentes inorgánicos como metales pesados, calcio, fosfato de magnesio, carbonatos y sulfatos, jabones cálcicos y ácidos grasos. (266,267)

La bilirrubina sería el 7% del peso seco del cálculo; los ácidos biliares 3% y el colesterol el 2% (158). Del resto del peso el 66% es insoluble en disolventes orgánicos. Entre los compuestos orgánicos discriminados se encuentran la bilirrubina no conjugada, los ácidos biliares, el colesterol, los ácidos grasos, los triglicéridos, polisacáridos y proteínas sobretodo del tipo de glico-proteínas sulfatadas. (225,268)

SUZUKI por espectrofotometría encontró más de 17 minerales: Ca, Mg, Na, K, Cu, Fe, Al, P, Pb, Si, Zn, Ag, B, Bi y Mo. (225, 269) BURNETT y cols encontraron además titanio. (265)

#### 10ª) DIFRACCION DE RAYOS X O CRISTALOGRAFIA DE RAYOS X:

Utilizada para el análisis de la naturaleza cristalina de los compuestos (258,270) y la formación del cálculo (271). SUTOR y WOOLEY los han analizado profundamente con este método y han obtenido porcentualmente la composición de un cálculo mixto o de colesterol en un estudio de cálculos practicado en 8 países. (254,258,270) Se han identificado más de 11 componentes. (TABLA II) Se encontraron Co y Fe relacionado con la bilirrubina, azufre con los polisacáridos sulfatados, manganeso asociado a la hidroxapatita y a la calcita. (260,263) Se determinan con microanálisis electrónico para determinar los microelementos. El aluminio y el silicio se han encontrado en escasas cantidades (271). Los compuestos del calcio suponen en total el 3% del material cristalino total. (270)

Se ha diseñado un esquema de la distribución espacial de dichos componentes. (260,263) (FIGURAS Nº 13 y 14)

Los cambios en el magnesio determinan la formación de apatita o whitlockita en los cálculos (263) ocurriendo de modo similar en los cálculos urinarios.

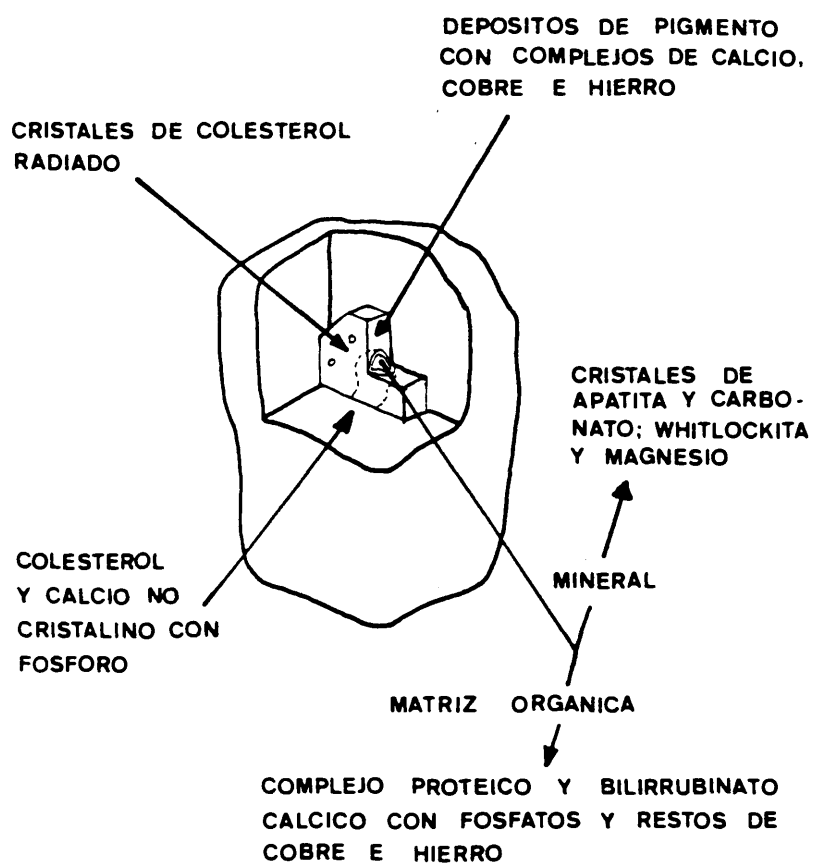
Los pigmentos y las proteínas se localizan en el núcleo y contienen cobre. En la bilis existen proteínas de alto Pm con afinidad por el cobre incluyendo la albúmina. De ello que aparece el cobre en los cálculos como consecuencia de la precipitación de sus proteínas ligadoras. (263) El hierro puede precipitar por la misma razón. Este tipo de alteraciones se puede producir por la alteración de los niveles de los componentes de la bilis (sales cálcicas inorgánicas, iones, etc) por la irritación de la mucosa.

La relación cobre-hierro varía según las regiones del cálculo y existe mayor cantidad de hierro respecto al cobre en zonas con bandas ricas en sulfatos y cercanas al núcleo. Estas bandas son ricas en proteínas y en algunas zonas hay también tejido fibroso.

Estos hallazgos se explican por ser un índice de hemorragia de la pared de la VB que da como resultado un complejo entre hierro y proteína fibrosa

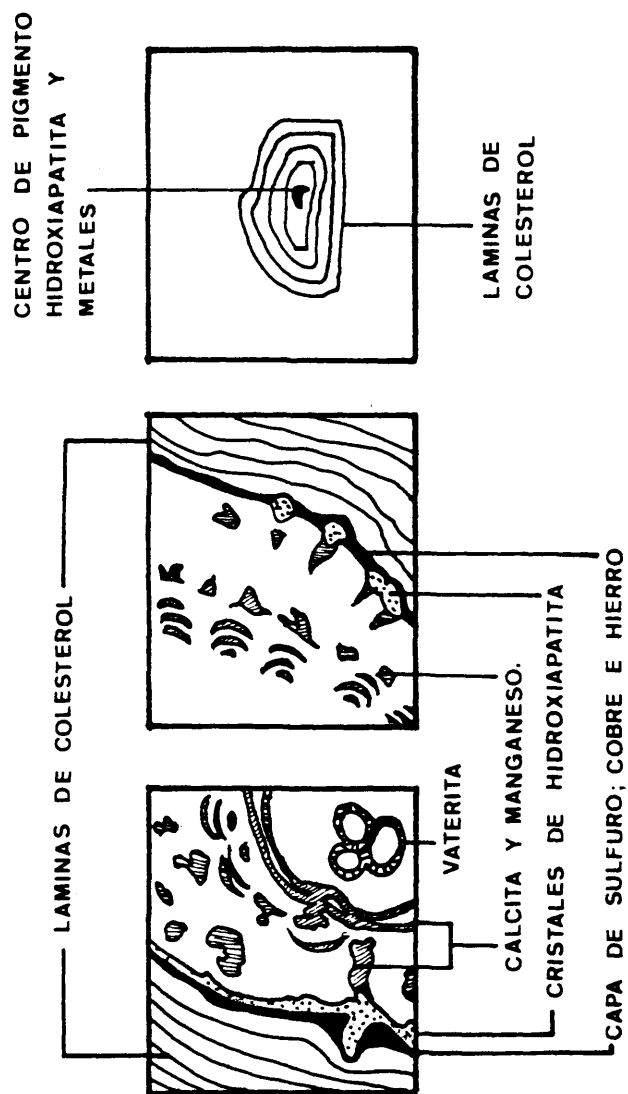
<u>COMPUESTO</u>	<u>PORCENTAJE (%)</u>
<u>COLESTEROL</u>	71
MONOHIDRATO	16
ANHIDRO	52.3
COLESTEROL II	2.7
<u>BILIRRUBINATO DE CALCIO</u>	10
<u>CARBONATO DE CALCIO</u> ( $\text{CO}_3 \text{ Ca}$ )	15.2
VATERITA	6.4
ARAGONITA	4.6
CALCITA	4.1
<u>FOSFATO DE CALCIO</u> ( $\text{Ca}_{10} (\text{PO}_4)_6 (\text{OH})_2$ )	2.8
APATITA	2.4
WHITLOKITA	0.4
<u>PALMITATO DE CALCIO</u> ( $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{14} \text{COO})_2 \text{Ca}$ )	5.9
<u>CLORURO SODICO</u> ( $\text{Cl Na}$ )	0.9
<u>ACIDO ALFA PALMITICO</u> ( $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{14} \text{COOH}$ )	0.1
<u>MATERIAL AMORFO</u>	3.1
<u>MATERIAL NO IDENTIFICADO</u>	1

TABLA II.- Porcentaje de cada uno de las sustancias componentes de los cálculos. Tomado de SUTOR y WOOLEY. (254)



**FIGURA Nº 13.-** Esquema del corte de un cálculo mostrando sus diferentes partes y su composición química.  
Tomado de BEEN y BILLS. (263)





A

B

FIGURA Nº 14.- Esquema de un cálculo A) a 50 aumentos y B) a 10x. Muestran la composición de las diferentes capas. Estudios de LEWIS. ( 260 )

(263). Este material fibroso se ha visto también con microrradiografías y scanning llegándose a pensar que este material actúa de núcleo sobre el que se depositan otros componentes del cálculo. (264)

#### 11\*) RESONANCIA NUCLEAR MAGNETICA:

Se está iniciando su uso con gran fiabilidad para determinar el colesterol, la bilirrubina, el calcio y el agua. (272)

### 4.2. FACTORES MODIFICADORES.-

#### .1.- CRECIMIENTO DEL CALCULO.-

Conforme se produce el crecimiento del cálculo se incitan una serie de modificaciones en la composición, siendo una evidencia indirecta del cambio en la composición de la bilis. (270)

En un cálculo cuyo núcleo sea de colesterol y las capas contengan carbonato de calcio, se demuestra que el núcleo se formó en una etapa en la que existía sobresaturación para el colesterol. Después esta saturación disminuyó y hubo supersaturación para el carbonato con lo que se produjo dicha precipitación.

De este modo la función de la VB modificaría la composición según el grado de saturación de los componentes de la bilis y sería la responsable de la aparición de sales de calcio en un cálculo y de la aparición o desaparición del colesterol. (270) El calcio se localiza fundamentalmente en las capas externas más que en el núcleo y centro.

#### .2.- SEXO.-

No se han encontrado modificaciones de la composición del cálculo

según la edad pero sí se ha visto una relación con el sexo. En los cálculos producidos en mujeres existe más colesterol mientras que en el hombre abunda más el palmitato y carbonato de calcio. (254)

También se han observado diferencias si tenían más o menos de 50 años y en relación al sexo. Cuando el cálculo tenía una evolución superior a los 6 años su contenido en colesterol crece como también se ha evidenciado. (273)

### 3.- RAZA.-

Comparando la composición de los núcleos de los cálculos según diferentes países se ha visto que existen variaciones poblacionales. En los de Inglaterra y Kuwait existe más carbonato cálcico; en India y Kuwait más fosfato cálcico; en Sudáfrica más palmitato de calcio y en Inglaterra más compuestos amorfos, excepto en Sudáfrica, en el resto de los 8 países estudiados por SUTOR Y WOOLEY (254) en un estudio multinacional, existía predominancia del colesterol en el cálculo que contenía más palmitato de calcio.

Significativamente en todos hay más cantidad de apatita y material amorfo y menos carbonato cálcico como vaterita y calcita en el núcleo que en la periferia, aunque existen variaciones dentro de los mismos cálculos de un país.

Comparando estudios los cálculos aparecidos en uno u otro país varían en una amplia gama, semejándose más los de la zona occidental y los de la oriental entre ellos, pero siendo bien diferentes ambos bloques. Los de tipo pigmentario se dan en Oriente siendo Japón, China, Hong-Kong, Taiwan, Malasia y Thailandia los más afectados. (219)

En un estudio practicado por SUZUKI mediante espectroscopia (217,274) se ha evidenciado que existen un 66% con predominancia de colesterol siendo 57% mixtos y 9% de colesterol puro; 32% pigmentarios son 9% puros y 23% de bilirrubinato cálcico; y 2% de cálculos raros que incluyen 1.8% de carbonato cálcico y 0.2% de palmitato cálcico.

En Inglaterra en un análisis de los cálculos realizado por BELL (173) por cristalografía se han visto un 58% de litiasis con colesterol siendo 35% puros (+95% de colesterol) y 23% mixtos (+ 70% de colesterol); 37% de calcio con 23% mixtos (-70% de colesterol) y 14% puros y un 5% de cálculos amorfos.

En Francia en un estudio de APRAHAMIAN (275) por cristalografía también muestra cambios poblacionales. Se hallaron 58.5% con colesterol incluyendo 33.5% mixtos y 25% de colesterol puro; 23% de tipo pigmentario y 18.5% minerales.

#### .4.- ALIMENTACION.-

En Japón se han realizado estudios sobre la evolución de la composición de los cálculos a lo largo de los años y se ha observado que ha ido modificándose con el aumento de los compuestos de colesterol y la disminución de la litiasis pigmentaria. (217,225,276,277) Esto ha sido llamativo de modo que en 1927 el 45% eran de colesterol, en 1958 el 61%, en 1967 el 85%, en 1974 el 90% con 10% de litiasis pigmentaria y curiosamente en 1978 el 70% con 25% de pigmentarios.

Esta evolución se ha atribuido a factores de raza pero sobre todo de alimentación. El que el pigmento sea la sustancia predominante en los cálculos de la región asiática, hace pensar en que tanto uno como otro factor o bien las costumbres influyen elevando la tasa de bilirrubinato cálcico. (172)

También se ha visto una curiosa diferencia geográfica dentro del mismo Japón. Así en Tokio ciudad en 1964 existían 69.5% de cálculos de colesterol frente al 23.7% de la zona rural del país. (198) Así de los 69.5% en Tokio además tenían 3.6: de cálculos de ácidos grasos y 22.7% de pigmentarios. En las ciudades medias el 34% eran de colesterol y un 57.2% pigmentarios y en la zona rural además de los 23.7% de colesterol había 58.7% pigmentarios y 9.9: de ácidos grasos.

Estas diferencias se han explicado por la infección de la bilis por E. Coli en el 100% de los pacientes con cálculos de la zona rural y en el 55% de se encontraron también parásitos como Ascaris Lumbricoides. estos parásitos se han relacionado directamente con la producción de cálculos pigmentarios. (278)

Los residentes en Honolulu o California que habfan adoptado la dieta y costumbres occidentales presentaban sin embargo cálculos pigmentarios muy raramente con disminución de la parasitosis intestinal. (172) Este descenso de la infestación hace también que decrezca la frecuencia de cálculos pigmentarios en las ciudades japonesas, pero menos en el campo por la higiene y sanidad más deficitarias. (217)

Se ha intentado explicar esta modificación por la mayor ingesta proteica que se ha producido recientemente en la población japonesa (279) y la emigración a las ciudades ya que más del 75% de ella vive en las ciudades en 1980. (280)

## 5.- TIPOS DE CALCULOS.-

La clasificación de los cálculos ha sido un tema complejo y lento dada la amplia variedad de ellos que existen y los distintos métodos por los que pueden ser valorados.

### 5.1. CLASIFICACION POR INSPECCION VISUAL.-

#### 5.1.1.- SEGUN EL COLOR:

Se clasifican por la morfología y el color, habiéndose demostrado la fiabilidad del método si se hace concienzudamente sometiéndolos a métodos químicos. (158) Se utiliza un método simplificado de la compleja clasificación visual propuesta por RAINS (181). Se pueden distinguir:

- DE COLESTEROL: amarillos claros tanto en la superficie como en el corte, mostrando éste una superficie radial y brillante.
- DE PIGMENTO: negros oscuros tanto interior como exteriormente y al corte se convierten en arenilla. (161,172)
- MIXTOS: de colores intermedios entre los anteriores, con bandas alternantes amarillas claras y marrones en su interior.
- RAROS: son considerados los cálculos con gran cantidad de sustancia que hacen del cálculo especial. Así si contienen muchos triglicéridos son de color naranja castaño (108), con una superficie granular y aspecto radiado al corte. Cuando se componen de gran cantidad de proteínas o polisacáridos son marrones oscuros, friables, irregulares y al corte no poseen ninguna estructuración. (281)

#### 5.1.2- SEGUN EL TAMAÑO:

La clasificación de los cálculos según el tamaño es fundamentalmente para aplicación clínica debido a las diferentes complicaciones que desencadenan. (59)

- MICROLITIASIS: si son menores de 3 mm. de diámetro. (23% de casos generalmente)
- PEQUEÑOS: si de 3 a 10 mm. (26%)
- MEDIOS: si oscilan entre 10 y 20 mm. (30%)
- GRANDES: mayores de 20 mm. (30.5%)

Entre los pacientes con microlitiasis se encontraron más casos de pancreatitis, colecistitis, colangitis e ictericia que en el resto. (59)

#### 5.1.3.- SEGUN EL NUMERO:

- UNICOS: son de gran tamaño por ser uno sólo y con una forma de molde de la VB que semeja un obús. Según LINDSTROM (282) en una revisión de VB en autopsias, existe un 26.6% de cálculos únicos.
- MULTIPLES: cuando son numerosos pudiendo llegar a cientos. El 36% de los casos tienen entre 2 y 10 cálculos; el 19.2% más de 10 y hasta cientos, siendo el 57% mujeres.

#### 5.1.4.- SEGUN LA FORMA:

Otros autores han instaurado clasificación de los cálculos de tipo morfológico por lo que ISPIZUA distingue (283):

##### • CALCULOS DE COLESTEROL:

- OVOIDEOS: de gran tamaño, únicos, de superficie lisa y color amarillo o blanquecino. Al corte su centro es estrellado y algo más oscuro mientras que la periferia es más blanca.
- MURIFORMES: pequeños, esféricos y de superficie granulosa o mamelonada semejando moras de color blanco. Son generalmente múltiples.
- ESTRIADOS: son de tamaño medio, de forma esférica irregular y se superficie espinosa y color blanco.

##### • CALCULOS PIGMENTARIOS:

- CORALIFORMES: son pequeños, de 2 a 5 mm. con prolongaciones como espinas y son numerosos generalmente.

- MURIFORMES: de mínimo tamaño, de gran número llegando a veces a millares, color negro muy duros de textura pero que con la presión se quiebran fácilmente.

- ABOLLONADOS: de forma de tetraedro con vértices redondeados y de tamaño mayor.

- CALCULOS MIXTOS:

- CUBICOS: son de forma de dado, bastante regular, siendo similares todos ellos en color, tamaño y forma cuando corresponden a una misma VB. El color suele ser claro desde el blanco al marrón oscuro en ocasiones.

- TETRAEDRICOS: afacetados por adaptarse unos a otros debido al elevado número que coexiste en una misma VB. Tienen una cara convexa que es la que se adapta a la mucosa vesicular.

- CANTOS RODADOS: varían mucho en el mismo paciente, siendo iguales sólo en el color. Oscilan entre cálculos muy grandes coexistiendo con otros pequeños, redondeados, abollonados y sin caras articulares. El color es del blanco, amarillo o marrón con tonos jaspeados.

- CALCULOS COMPUESTOS:

En general son los de mayor tamaño.

- CILINDRICOS: formados por 1 o 2, alargados y con el centro de colesterol y la periferia con capas como los mixtos. Son muy grandes de tamaño.

- TONELES: únicos, de forma de tonel, y son superficie rugosa, centro de colesterol y periferia con estratos de composición mixta.

- FACETADOS: tetraédricos, también muy grandes y con el núcleo de colesterol y alrededor radiado.



- COMPLEJOS: más raros. Son una masa compuesta por un gran número de cálculos unidos por una sustancia cementante de color oscuro. Se puede distinguir como si se formaran de varios cálculos más pequeños pegados, por lo que su superficie es abollonada.

## 5.2. CLASIFICACION POR COMPOSICION QUIMICA.-

### 5.2.1. POR CRISTALOGRAFIA:

Por este método SUTOR y cols. (266) han visto 3 grupos de cálculos:

- COLESTEROLICOS: son el 60% y contienen colesterol fundamentalmente.
- DE CALCIO: son el 13%. Compuestos de Carbonato cálcico (aragonito, vaterita y calcita); palmitato de calcio; fosfato de calcio (apatita y whitlockita) y bilirrubinato cálcico.
- MIXTOS: el 27%. Formados de una mezcla de todos los componentes.

### 5.2.1. POR ESTUDIO QUIMICO:

BOCKUS en 1976 (256) propone una clasificación que es la utilizada generalmente, no admitiendo la existencia de cálculos puros o siendo excepcional. Utiliza el contenido de colesterol como agente de delimitación, de modo que se habla de cálculos de colesterol, mixtos o pigmentarios según el % del colesterol. (TABLA III) Esta clasificación es modificación de otra similar que los dividía en:

- COLESTEROL PURO RADIADO
- MIXTOS DE COLESTEROL+BILIRRUBINATO+ SALES DE Ca
- MIXTOS DE COLESTEROL RADIADO + CAPAS MIXTAS
- PIGMENTO + CARBONATO Ca

- PIGMENTO SIN CARBONATO Ca
- FORMAS RARAS

Los 3 primeros son el 85% y los compuestos de pigmento el 15%.

Los pigmentarios según TROTMAN y cols. (284) se dividen según contengan o no carbonato cálcico. Cuando lo contienen son más pobre en bilirrubinato y sin embargo más ricos en calcio y fosfatos. Según KAMEDA (198) las formas raras son el 1.6% del total incluyendo cálculos de triglicéridos, proteínas y calcio puro.

BOCKUS (199) describe los pigmentarios como los de pigmento puro que pueden formarse sobre condiciones asépticas y tener al corte sólo restos de colesterol. MAKI (164) diferencia éstos de otros pigmentarios que se forman por alteraciones metabólicas como cirrosis, hemólisis, etc. llamados PIGMENTARIOS PROPIAMENTE DICHOS y de color negro tanto interna como externamente de otros formados por infecciones sobretodo por E. Coli que se pueden formar también en los conductos intrahepáticos siendo de color marrón o castaño oscuro y que él denomina de bilirrubinato cálcico. En los primeros el residuo final del cálculo es de 46.6% mientras que en los infecciosos es sólo del 9.1%. (164)

CLASIFICACION DE LOS CALCULOS. (BOCKUS, 1976)

- CALCULOS DE COLESTEROL PURO: + 75% de colesterol.
- CALCULOS MIXTOS Y DE COMBINACION: colesterol + pigmento.  
Los mixtos tienen una distribución en capas del pigmento no homogénea y los de combinación sí.
- CALCULOS PIGMENTARIOS: - 15% de colesterol.
- CALCULOS DE CARBONATO CALCICO.
- CALCULOS RAROS:   TRIGLICERIDOS  
                          PROTEINAS  
                          CALCIO PURO

TABLA III.- Clasificación de los cálculos según el contenido de colesterol evidenciado por estudio de lámina delgada al microscópio. Tomada de BOCKUS. (256)

#### IV.- MUCOSUSTANCIAS.

En las últimas décadas se han conseguido identificar en la bilis y en los cálculos unas sustancias mucoproteicas que han adquirido importancia para la litogénesis debido a la creencia de que pueden constituir el núcleo iniciador sobre el que tras aposición de sustancias se desarrolla el cálculo. Por ello que ocupe este tema un apartado primordial en la presente Tesis.

#### 1) COMPOSICION QUIMICA.-

El MOCO ha sido muy estudiado y se ha utilizado el término de modo vago e indeterminado. (285) Se denomina MUCOSUSTANCIA a un amplio grupo de sustancias orgánicas denominadas genéricamente mucinas, moco, mucopolisacáridos, mucoproteínas y glicoproteínas. (286) Químicamente se componen de un grupo de carbohidrato y otro grupo por lo que pueden distinguirse 3 tipos. (287)

Son un tipo de sustancias fundamentales para el organismo constituyendo el esputo, moco vaginal, moco gástrico, etc. (285).

1.1. MUCOPOLISACARIDOS: formados por proteínas y polisacáridos, predominan fundamentalmente los carbohidratos que constituyen el 70% del peso (95). Se encuentran muy repartidos en el organismo y las reacciones tintoriales para su determinación son muy complejas.

1.2. MUCOPROTEINAS: sinónimo de glicoproteínas. Formados por polisacáridos y proteínas, predominando éstas. Se encuentran en el coloide tiroideo, membranas basales, células beta hipofisarias y en el material amiloideo. Su reacción es PAS (+) dado que enmascara la proteína la reacción de los polisacáridos.

#### 1.3. MUCOLIPIDOS:

o glicolípidos. Formados por polisacáridos y ácidos grasos sobretodo. Existen como cerebrosidos y gangliósidos en el sistema nervioso y son PAS (+) con reacciones positivas a las tinciones específicas para lípidos.

#### 14. MUCOPOLISACARIDOS.-

Son junto a las mucoproteínas las más interesantes. Existen dos grupos:

. a.- NEUTROS:

Cuando se forman de unidades de hexosamina y hexosa sin grupos ácidos libres. Se encuentran en el epitelio gástrico, glándulas de Brünner del duodeno y en las células caliciformes del colon. Son PAS (+) y AA (-).

. b.- ACIDOS:

Si se componen de unidades de hexosamina que pueden asociarse a ácido glucurónico, idurónico o siálico. También pueden tener radical sulfato y si no lo tienen la reacción tintorial se debe al carboxilo de los ácidos. Entre ellos se distinguen subtipos según el grado de sulfatación: (FIGURA Nº15)

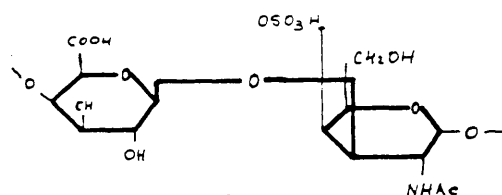
- MUCOPOLISACARIDOS ACIDOS MUY SULFATADOS:

1.- CONDROITIN SULFATOS: pueden ser de 3 tipos a su vez. El A o 4-sulfato de condroitina; el B o dermatán sulfato y el C o 6-sulfato de condroitina. Son compuestos que forman parte de cubiertas celulares, cartílago, hueso, córnea, etc. El tipo B se localiza en la piel, aorta y cordón umbilical. (287)

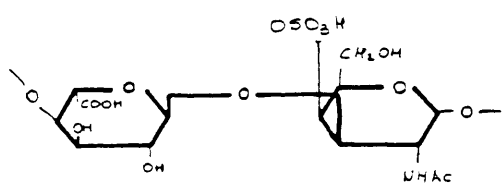
2.- HEPARAN SULFATO: se encuentra en los pulmones y paredes arteriales.

3.- QUERATAN SULFATO: localizado en la córnea y hueso. Se tiñen con AA pH=0.5 o menor, son metacromáticos a pH=1 y se tiñen menos con colorantes como AA-PAS al que es (-). Su grupo ácido es el radical sulfato.

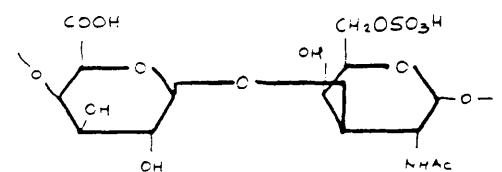
- MUCOPOLISACARIDOS ACIDOS POCO SULFATADOS:



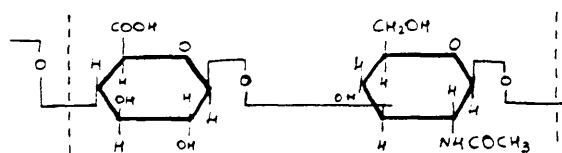
CONDROITIN SULFATO A



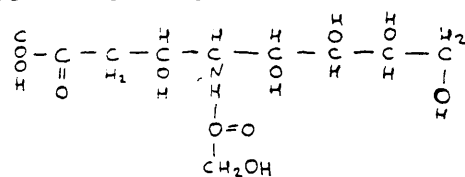
DERMATAN SULFATO



CONDROITIN SULFATO C



ACIDO HIALURONICO



ACIDO SIALICO

Su radical reactivo también es el sulfato pero las reacciones son a pH mayor de 1 con el AA y tienen metacromasia a AA= 1.5-3. Se localizan en los epitelios y son reactivas al peryodato a diferencia de las muy ácidas y tienen también basofilia débil.

Se encuentran en las células caliciformes de cólon y duodeno.

- MUCOPOLISACARIDOS ACIDOS NO SULFATADOS:

Incluyen también 3 grupos principales:

1.- ACIDO URONICO: El principal es el grupo hialurónico y reacciona con las mucinas ácidas debido a los grupos carboxilo del ácido-D-glucourónico. Sus tinciones son PAS (-) y reacciona con otras mucinas no sulfatadas frente al AA.

Se ve en sustancia intersticial extracelular de los tejidos conectivos de mamíferos, en mesoteliomas, líquido sinovial de las articulaciones y en el cordón umbilical.

El enzima hialuronidasa cataliza su hidrólisis produciendo un descenso en la viscosidad. Es soluble en agua formando disoluciones muy viscosas.

2.- SIALOMUCINA: Se compone de ácido siálico que es un derivado del ácido neuramínico acetilado. Se digiere con la sialidasa o neuraminidasa. Tiene un grupo reactivo carboxílico que reacciona con el AA pH=2.5 y da metacromasia a AA pH=3.

Se ve en células caliciformes de las vías respiratorias superiores e intestino así como en glándulas submaxilares.

3.- MUCINAS HIALURONIDASA Y SIALIDASA RESISTENTES: Su grupo ácido reactivo es el carboxilo. Contiene N-acetil-O-diacetil neuramínico y ello le confiere resistencia a la digestión enzimática por lo que no reacciona con el PAS. Se encuentra en las glándulas pilóricas del estómago. (287)



## 1.2. GLUCOPROTEINAS.-

Son sustancias gelatinosas, pegajosas, resbaladizas que actúan como lubricantes y otras como cemento intercelular flexible.

El porcentaje en peso de los glúcidos en las glucoproteínas puede oscilar entre 1% en la ovoalbúmina al 80% en las mucoproteínas. Las glucoproteínas con alto contenido en glúcidos se denominan PROTEOGLUCANOS.

Se producen en las células caliciformes (95) de muchos epitelios. El corazón del péptido se sintetiza en los ribosomas del RER y se transporta a través de canales hasta el complejo de Golgi donde sufre glicosidación y sulfatación. (287) Por ser grandes moléculas se sintetizan como pequeñas unidades que se polimerizan después en las vesículas del Golgi.

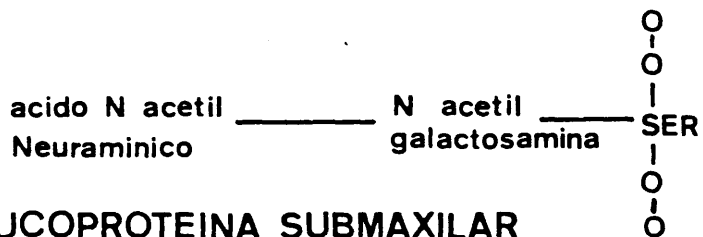
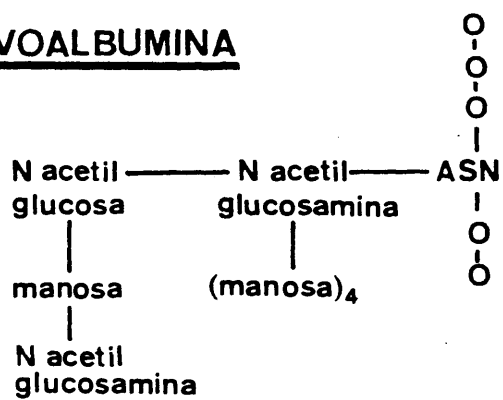
En los vertebrados estas glucoproteínas son extracelulares en su mayoría. Se ha indicado incluso que una finalidad de los restos de azúcar ligados es la de marcar la proteína que ha de ser exportada de la célula. Entre estas glucoproteínas extracelulares se encuentran las que componen la cubierita celular, las cubiertas sanguíneas, hormonas, proteínas especiales, anticuerpos, enzimas digestivas secretadas al intestino, mucoproteínas de las secreciones mucinosas y las de los basamentos de las membranas.

En su composición se han encontrado gran variedad de monosacáridos diferentes y derivados de los mismos. La unidad terminal es un resto cargado negativamente de ácido N-acetil-Neuramínico y ácido siálico. Las uniones de los aminoácidos (aa) son covalentes y pueden pertenecer a 3 tipos distintos. (113) (FIGURA Nº 16)

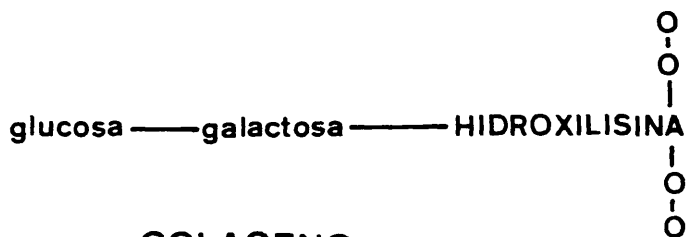
Respecto a su composición bioquímica se caracterizan según FORSTNER por (95):

- peso molecular mayor de  $1 \times 10^6$ . (285)
- cuerpo peptídico de menos del 30% del peso.
- rico en los aa: treonina, prolina. (glicina-alanina)

## OVOALBUMINA



## MUCOPROTEINA SUBMAXILAR



## COLAGENO

FIGURA Nº 16.- Representación de los 3 tipos de uniones a los aminoácidos (aa) de los monosacáridos en las glucoproteínas.

- poseer grupos O-glucosídico-Col-N ac-TRIP-SER entre el péptido y el azúcar, mientras que las proteínas del plasma tienen N-glucosídico. (285)
- cadenas oligosacáridas de más del 70% del peso.
- estar compuestos con galactosa, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, fucosa y ácido siálico.
- estar sulfatados frecuentemente.
- no contener manosa, glucosa ni ácido urónico.
- ser viscosas y formar geles.
- ser polidispersos.

Además poseen especificidad del grupo sanguíneo con el método ABO y el de Lewis y otros determinantes. (95)

La solubilidad del moco se cree debida a las interacciones de la mucina con otros componentes como lípidos, ácidos nucleicos, ácidos y álcalis inorgánicos, sales, proteínas séricas y enzimas así como también se interaccionan con administración de drogas orales. (95,288) Cuando se asocian a la albúmina sérica se forman complejos que modifican la viscosidad. Las modificaciones del pH también lo altera y se puede decir que una elevación o disminución del mismo en las seroproteínas hace que las mucinas normales sufran una transformación patológica formando un gel viscoso o un precipitado insoluble.

## 2) SECRECCION Y REGULACION.-

El moco en general se secreta por las células mucosas o caliciformes del epitelio del tracto gastrointestinal entre otros. Se compone en conjunto de glicoproteínas o mucinas que ya se han estudiado, agua, electrolitos, residuos de las células epiteliales, bacterias y productos bacterianos, proteínas plasmáticas, sales biliares, enzimas pancreáticas y otros componentes del

jugo intestinal, cuando nos ceñimos a analizar el moco de esta localización.

Se sintetiza en las células y se secreta moco continuamente del mismo modo que ascienden desde la cripta del origen hasta el extremo de la vellosidad donde se libera o se suelta como en escaras. Se desconoce si su liberación es un proceso de exocitosis continuo (289) o es por liberación controlada apocrina de muchas vesículas al tiempo. (290)

Sus características tintoriales se toman por el polipéptido o azúcar en el gránulo donde se almacenan y no en el RE o Golgi. (17) En el gránulo su tinción es idéntica a cuando se ha secretado y está en la superficie del epitelio (285) aunque se piensa que los diferentes tipos se diferencian al unirse varios productos fuera de los gránulos secretorios.

#### REGULACION DE LA SECRECCION.-

##### 1ª) SUSTANCIAS IRRITANTES.-

Se estimula la secreción por las sustancias irritantes del tipo de aceite de oliva, alcohol y triglicéridos. (95)

##### 2ª) DROGAS COLINERGICAS.-

Estimulan la secreción de glicoproteínas y los agentes parasimpaticomiméticos estimularían las glándulas mucosas pero no a la secreción de las células caliciformes por lo que parece que hay diferentes mecanismos de control.

Los agentes adrenérgicos estimularían la síntesis de las mucinas mientras

que los parasimpaticomiméticos activan el estado de liberación de la mucina de las células.

### 3ª) HORMONAS.-

La serotonina es un claro estimulante del moco (95) pero ni la colecistoquinina ni el péptido vasointestinal se han demostrado activas frente a él.

### 4ª) VITAMINAS.-

El déficit de la vitamina A provoca hiperplasia de las mucosas en algunos epitelios y por tanto producción de moco. (227)

### 5ª) MEDICAMENTOS.-

Tanto la aspirina como la indometazina así como drogas antiinflamatorias no esteroideas producen una inhibición de la secreción del moco. (81,88) Proporcionan también una inhibición de la nucleación del colesterol pero no afecta a la saturación de los lípidos en la bilis. (291)

## 3 ) LOCALIZACION DE LAS MUCOPROTEINAS.-

Para el reconocimiento y aislamiento de las mucoproteínas (MP) en los diferentes tejidos se han utilizado múltiples técnicas aplicadas en la VB, bilis y cálculos biliares de los humanos.

### 3.1.- VESICULA BILIAR.-

Se han practicado numerosas técnicas histoquímicas introducidas en la VB humana por LAITIO en 1972 (14). Son un método combinado de histología y análisis químico.

- PAS:

Se ha realizado de modo efectivo para analizar los medios hidrocarbonados que reconoce los grupos hidroxilos. Los tipos neutros son siempre (+) mientras que las ácidas pueden o no serlo. Las del tipo conectivo son negativos al PAS y las sialomucinas lábiles a la sialidasa tienden a ser PAS (+).

- AA pH=2.5 y pH=1:

LAITIO (19,292) lo ha utilizado para ver sustancias y distinguir entre neutras y ácidas. Con el AA se tiñe cuando el cambio electrolítico de los polianiones se une con la molécula catiónica del AA. (43) El pH al cual se produce la unión determina la disociación del radical ácido (ácido siálico, ácido sulfónico de la glucoproteína). De ello que a pH=1.0 se tiñan las glicoproteínas sulfatadas y a pH=2.5 las sulfatadas y las del ácido siálico. Los diferentes pH sirven para demostrar presencia de grupo sulfatos-éster o carboxilos. (43)

- HIERRO DIAMINA + AA pH= 2.5:

Se ha utilizado para separar ácidos sulfatados de las mucinas ácidas no sulfatadas. (293)

- HIERRO COLOIDAL:

A un pH bajo se adsorbe por los ácidos de los tejidos. No es tan selectivo como el AA pero tiñe los ácidos nucleicos. (287)

- ALDEHIDO FUCHINA:

Permite separar mucinas sulfatadas de las no sulfatadas. El ALDA-FUC tiene mayor afinidad por los grupos sulfatos. El AA se utiliza a pH=2.5

para contrastar y teñir los carboxilos.

Con todas estas técnicas se han podido determinar tanto en humanos como en animales de experimentación con litiasis de la VB sometidos a dieta litogénica (46,63), la existencia de vesículas interepiteliales en el conejo y en el ratón en las zonas apicales sobretodo. En el humano también se han visto y por su tipo de tinción se puede pensar que es un contenido mucoproteico por ser (+) a la reacción del PAS. (71,294)

Esta tinción es más intensa en el fundus de la VB aunque también se tiñe en la zona del cuello. Cuando se practica en animales sometidos a dieta litogénica, la tinción se hace más positiva conforme aumenta el tiempo de duración de la dieta. (86)

Tomando como evidencia la presencia de moco en los gránulos debido a su reacción positiva a las tinciones y al PAS, y la intensidad del teñido, y relacionándolo con la cantidad de esa MP se puede deducir que existe un incremento en la producción del moco (43) en VB formadoras de cálculos. Este incremento de la intensidad de la tinción permitiría distinguir los grupos formadores de cálculos de otros controles donde no se producen esos signos inflamatorios.

El patrón de tinción sugiere que la mucina de las VB de los animales se encuentra en el grupo de las glicoproteínas débilmente ácidas con mínima sulfatación. No se han encontrado por parte de estudios de algunos autores (43) modificaciones cualitativas en el moco. En los 3 modelos utilizados por LEE (43) para tinción, no hubo variación en las reacciones tintoriales. Sí se produjo un aumento de la tinción con el AA pH=1.0 aunque no fue significativa cualitativamente y sí cuantitativamente.

En ocasiones, sin embargo, se ha visto variación en la posición del monosacárido en condiciones patológicas (295) como en la colitis ulcerosa. Se ha observado que el contenido de manosa era estadísticamente representativo y mucho más alto que en los controles u otro tipo de enfermedades.

Estos hallazgos son similares en la glándula parotídea, relacionándose con la viscosidad del moco.

El hecho de que no existan diferencias cualitativas va a favor de pensar que la VB responde de una manera muy limitada a las noxas aunque sean diferentes (dieta, ácidos biliares extraños, tóxicos, etc) basándose siempre en el incremento de la producción de moco, de la proliferación celular (41) y del transporte de fluidos a través de la mucosa. (296) Esta proliferación y la metaplasia glandular son el estadio inicial del desarrollo de las glándulas tubuloalveolares. Esta metaplasia se desarrolla de modo focal y no difusa

El resultado de la histoquímica en teoría tendría que mostrar una mayor proporción de glucoproteínas poco ácidas de origen glandular y menos de las más ácidas producidas por las células normales. (25) La uniformidad química es grande a pesar de la gran variedad vista en los gránulos secretorios dentro de una sólo célula e incluso de un mismo gránulo. Muchas veces no se pueden identificar en los gránulos o células los componentes hallados por el químico, al purificar la molécula de MP, es decir contenido sulfatado y ácido siálico. Este pigmento se ha visto en las células columnares y en las glándulas del cuello de la VB. En las áreas profundas hay menos mucina intracelular. (19) La mucina sulfatada se da más comúnmente allí, mientras que las ácidas no sulfatadas o las neutras se encontraron en zonas metaplásicas y en células caliciformes.

Existe una relación en la cualidad de las mucinas en las células caliciformes pues cuando la mucina es sulfatada allí, también lo es en otras localizaciones y las no sulfatadas o neutras son escasas. Esta diferenciación en las mucinas es importante por la relación con la fisiología de la colelitiasis. (294)

Si la célula tiene varios tipos de mucina, la zona del Golgi o supranuclear contiene siempre menos mucina ácida, indicando un cambio irreversible. Se han observado relaciones entre la metaplasia y los cambios en la mucina celular y el origen de tumores aunque no se sabe cómo. (297)





LEE y cols. (296) opinan que estas macromoléculas son secretadas por la VB dentro de la bilis e incorporadas posteriormente a los cálculos ya que se han encontrado MP similares en la mucosa de la VB, bilis y cálculos. (298)

Ya en 1856 MECKEL von HEMSACH (299) estudió la formación de perlas atribuidas a la acumulación de mucina de la VB que actuaría de núcleo para la formación de los cálculos. Se han podido observar cristales de colesterol que se localizan en unas bolsas de mucina en los nichos de la pared de la VB. (21)

El gel de mucina actuaría de nucleante del colesterol además de haberse observado uniones del lípido a la mucina en estudios practicados sobre absorción de colesterol tanto en la bilis como en el intestino. (291) Esta mucina contiene unas moléculas hidrofóbicas en los aa de los componentes no glucosídicos que atraen a los microprecipitados de lecitina-colesterol que se encuentran en el medio sobresaturado de la bilis y acudiendo a esa zona preferencial inician el crecimiento del cristal. Este mismo método es utilizado por la industria para aumentar el crecimiento de cristales puros en un sistema sobresaturado. (300)

La secreción del moco es más intensa en las glándulas submucosas y localizadas en los senos de RA (87). HULTEN (4,21,57) incluso ha visto nichos de la VB que contienen moco (37) y allí se transforma en un gel más viscoso por absorción de agua y electrolitos y se produce la disminución del pH. El colesterol precipitaría en estas bolsitas de gel, ya que las MP son grandes moléculas que tienen un área existente para provocar epitaxia y adherir cristales. (86) Estos precipitados irían a la luz de la VB y en la bilis darían concrecciones mayores que se favorecen ante la presencia de otro material proteináceo como la fibrina o restos de células degeneradas. Estos dos factores junto a la presencia de bacterias son signos de inflamación y en este tipo de coyuntura se producen cálculos mixtos pues el calcio y la bilirrubina se pueden mezclar más fácilmente con el colesterol.

De manera experimental se ha observado que en conejos normales no aparece moco en la VB pero al suministrarse dieta rica en dihidrocolesterol

que es favorecedor de la litogénesis, aparece un acúmulo de gel mucoso en la VB, antes de que surja el cálculo, por lo que el mecanismo irritativo producido por el cálculo queda excluido. (8,25) Este hecho también se ha observado en ratones. (49) LEE y cols. (301) lo han evidenciado en los perros de la pradera y midió este hecho por la incorporación de glucosamina marcada con  $H_3$ , pues es un precursor que se incorpora a las MP epiteliales. Se ha demostrado en mucosa de colon y en otros tejidos. (302)

El efecto estimulador de la dieta litogénica de colesterol sobre la secreción de MP parece ser un hecho específico del epitelio de la VB pues ni el estómago ni el colon manifiestan este incremento en cultivo de estos órganos a pesar de que también se exponen directamente a esta dieta. (301)

FRESTON y cols. (86) cuantificaron este proceso mediante la valoración de la secreción de hexosamina a la bilis que estaba notablemente elevada en conejos sometidos a dieta litógena, pero otros autores han evidenciado el mismo proceso en el hombre (294,296,303) estudiándose en VB tanto por métodos histoquímicos como por microscopio electrónico.

Se han practicado también estudios sobre la producción de moco vesicular y de antígenos producidos en la mucosa intestinal (304) observando que no se produce reactividad inmunológica en la VB normal pero sí en las que tienen metaplasia glandular. Con los antisueros específicos se han descubierto antígenos en este tipo de patología, determinándose CEA (antígeno carcinoembrionario); LIMA (antígeno mucinoso del intestino delgado) y SIMA (antígeno mucinoso del intestino grueso) (304)

Esta producción de mucinas inapropiadas por la metaplasia e incluso por un epitelio neoplásico de la VB hacen positiva la búsqueda de otros antígenos y servirían como test diagnósticos con una importante implicación clínica.

### 3.2.- BILIS.

Se han detectado mediante análisis de electroforesis, MP en la bilis de VB inflamadas o con cálculos y en casos de fístulas biliares, siendo la bilis más viscosa que en condiciones normales, pero nunca se han visto en VB normales.(86,296)

En personas sanas el contenido de proteínas en la bilis hepática es de 100 microgramos /dl. de las que el 20% son mucinas y el resto albúmina, glicoproteínas, inmunoglobulinas y el 55-75% son carbohidratos en el humano y los principales son la galactosa, la fucosa y N-acetil-glucosamina que supone el 70-85% de todos los monosacáridos. La manosa, glucosa, N-acetil-galactosamina y N-acetil-Neuramínico o siálico también se dan. Este último en bilis de VB con ulceraciones o marcada inflamación. (296) En VB con cálculos no predominan la glucosamina, la galactosamina ni la galactosa como en la VB normal y la glucosa, arabinosa, ribosa y fructosa están muy disminuidas. (305)

También se han identificado por estudios de espectro de absorción ultravioleta las características de solubilidad y por la positividad con la reacción al PAS practicada en la bilis. La MP encontradas en la bilis parecen ser del tipo ácido sulfatado. (182) Este moco sería secretado por las células epiteliales de la membrana epitelial de la VB. Este moco otorga a la bilis características de solución coloidal por sus propiedades, aunque no es uniforme su composición química. Cuando absorbe agua y electrolitos, la solución coloidal mucosa se torna más viscosa y finalmente llega al estado de gel. (4)

BOUCHIER y cols. (268) mediante la medición de hexosamina que el componente de las MP vió que en la bilis de pacientes con litiasis predominaba una gran cantidad de MP que en una persona normal y aún más cuando existe infección de la pared de la VB. (286, 303)

SOBOTKA (306) en 1937 inició este estudio de las MP en la bilis por medición de la viscosidad mediante viscómetro de flujo capilar y de la hexosamina por reacción de ELSON Y MORGAN con una modificación de BOAS indicando que estas sustancias sólo se encontraban en la bilis patológica.

VERSCHURE en 1962 (268) también introdujo el papel de la electrofore-

sis y demostró en la bilis una fracción inmóvil que demonimo "P<sub>4</sub>" y resultó ser de tipo mucoso. Ya MAXFIELD Y WOHINS en 1959 demostraron que era una MP debido a sus características histoquímicas. Por inmunolectrofore-sis también se vió que estas sustancia mucosa de la bilis no participa de los mismo determinantes antigénicos que las proteínas séricas.

El contenido de hexosamina es mayor en las VB con litiasis y ello es más llamativo si se expresa en función de los sólidos totales de la bilis, por lo que parece sólo considerarse como consecuencia de la concentración de la misma, sino como signo de anormalidad dela VB. Sin embargo en cone-jos, esta misma experiencia mostró disminución de esta concentración de hexosamina en bilis, siendo explicado por la posible aposición de estas sustan-cias en el cálculo por un artefacto.

Este contenido de hexosamina es más elevado en presencia de cálculos, quizá por el factor oclusivo del cístico que incrementa el poder secretorio de la VB. (12,37,52,86) Este factor estimulante de la secrección está probable-mente en la bilis, y acompaña o precede a la formación de cálculos de coles-terol pero no de los pigmentarios, pudiendo además estimular la actividad proliferativa mucosa. (40)

Seriando la medición de hexosamina en conejos sometidos a dieta litogé-nica, según sea antes, durante o después de la formación de cálculos, se de-muestra que esta secrección de MP precede a la formación del cálculo. (43) No continúa el aumento de la hexosamina tras el periodo de máxima aparición se cálculos pero sí aumenta el contenido del material en la luz vesicular en relación al crecimiento del cálculo. Este hecho puede resultar un reflejo de la incorporación de sustancias mucosas a los cálculos y a adsorción en su superficie, más que al incremento real de la secrección. (37) Esta mucina po dría ser el agente nucleante en la bilis anormal, dando cuenta de un tiempo de nucleación acortado observado en estos casos de litiasis. (307,308)

Existe una gran variedad en la viscosidad de la bilis, confirmándose existencia de 2 tipos: una densa y pegajosa y otra clara y acuosa. Dado que la bilirrubina conjugada no se reabsorbe en la VB se utiliza como índice de

concentración biliar, observándose mayor concentración en las bilis patológicas, y una relación entre este hecho y la viscosidad relativa. Por ello que se encontró una correlación entre la concentración de hexosamina y la viscosidad pero no entre esta última y los valores de bilirrubina. Así la viscosidad depende del grado de concentración de la bilis y del contenido de hexosamina, por lo tanto de las MP.

La interrelación entre síntesis de moco y secreción y composición lipídica de la bilis no se ha estudiado en detalle a pesar de la importancia que el colesterol tiene en la patofisiología de los cálculos biliares. (301)

Cuando se produce una hipersaturación de la bilis también se da una hipersecreción mucosa. Esto hace pensar que el colesterol pudiera ser el estímulo para la secreción y síntesis de MP. El mecanismo por el que este proceso se desencadenaría ha sido motivo de hipótesis. El colesterol de la bilis elevado podría transferirse dentro de la membrana apical de las células de la VB, alterando las propiedades y liberación del moco. En los guinea-pig se han encontrado incluso micelas de colesterol absorbidos por el epitelio de la VB. (301)

Otra teoría se basa en que el estímulo sería otra sustancia de la bilis que no el colesterol. Este agente nucleante actuaría en la VB pero no en el hígado y así mantendría el estímulo para convertir el colesterol micelar supersaturado en precipitados de colesterol.

Agregando gel mucoso a la bilis hepática saturada se ha conseguido provocar nucleación igual que se pueden prevenir los cálculos experimentalmente si se inhibe la secreción de moco. De ello que autores como LEE (301) opinen que es el moco el agente nucleante específico en la formación de cálculos de colesterol. Si esto se confirmara en el hombre, sería factible prevenir mediante agentes farmacológicos la secreción del moco en la bilis, inhibiendo por tanto la producción de cálculos.

Por la absorción del agua y electrolitos que realiza la VB, el moco se acumula en la zona cercana a la membrana y hace que el pH torne hacia la acidez contribuyendo a la transformación en gel y al aumento de la viscosi-

dad.

BROHNER en 1933 (4) atribuyó el grado de acidez a la alimentación y pensó que la dieta vegetal elevaba la alcalinidad, oscilando entre pH=6.5 y 7.5 mientras que con la dieta de carne se llegaba a pH=4.8.

La secreción de moco es paralela a la concentración de bilis, siendo estudiada en varias especies animales, aunque en el cerdo, vaca y oveja no se concentra manteniéndose la misma concentración en la bilis hepática y vesicular. (57)

### 3.3.- CALCULOS BILIARES.-

WOMACK y cols. (107) han detectado en los cálculos un núcleo PAS (+) con prolongaciones fibrilares hacia la periferia. Se supuso que eran el núcleo o nido del cálculo en el que se comienzan a superponer las sustancias cristalinas. De modo similar en los cálculos urinarios existe una matriz o NEOMUCOIDE. Incluso se ha evidenciado en cálculos de carbonato cálcico que se consideran amorfos, una estructura específica debido a la distribución de las MP por estudios de NAKEMUSA. (164,274)

Mediante tinciones con el método de la lámina delgada se ha descubierto que estas MP son de tipo ácido (228) dando metacromasia intensa con azul de toluidina, AA al que es (+) y también (+) débil con el PAS. Estas MP sulfatadas son una de las sustancias más fuertemente coagulantes entre los componentes de la bilis actuando como polimerizadores.

Con el analizador tipo EDAX se han descubierto hasta 10 tipos de proteínas distintos en los cálculos siendo 2 las principales. (256) Una de ellas es de Pm= 67.000 y la otra de Pm= 15.000, pudiendo ser parte de otra mayor ya degradada y que se liga a pigmentos y no se tiñe con el azul de toluidina y sí por el azul de Coomasia.

La proteína de Pm mayor es muy resistente a la hidrólisis alcalina

y aunque se parece mucho a la albúmina no es como la sérica.

Otras proteínas tienen una fuerte unión al pigmento por lo que es más difícil determinar su Pm. Estas dos principales se asocian y forman estructuras arborescentes con esferas colocadas en las puntas.

Se piensa que el polisacárido daría una estructura filamentosa o reticular (86,161,309), que originarían la trama del cálculo biliar atrapando las proteínas en los diferentes periodos durante la formación y posteriormente éstas ligarían a los pigmentos. (87,107)

Esta matriz orgánica se ha separado por métodos químicos, previa disolución de los lípidos del cálculo por el éter; de las proteínas por el agua y de una tratamiento con agua oxigenada, seguido de una solución de NaOH 0.1 N aislándose fibras que dan una reacción positiva a los azúcares y con gran afinidad por los pigmentos. (256) Tienen 2-3 mm. de longitud, existiendo otras más cortas. Se tiñen en rojo por el azul de toluidina lo que se denomina metacromasia.

Otro método de estudio por disolución fue el utilizado por SUTOR y cols. (309). Disuelve el colesterol y el carbonato y fosfato cálcicos resultando una material gel-like. Se utiliza el cloroformo para disolver los componentes orgánicos como el colesterol y el ácido clorhídrico para el carbonto y fosfato cálcicos. Son reacciones fuertes sin embargo que pueden romper a menudo la matriz por lo que se usa la solución acuosa al 4% de sal sódica del ácido quenodexosicólico y después una solución de EDTA o formalina. La matriz final tras la disolución varía según el material cristalino al que se asocia. Tiene color amarillo, tostado, anaranjado o a veces negro, cuando se le observa por difracción de rayos X.

Midiendo la concentración de MP por la concentración de hexosamina se ha visto que los cálculos de más tamaño tienen menos MP que los pequeños teniendo más Hexosamina total en los cálculos grandes, pero el contenido de la misma relacionándolo con el cálculo descende al aumentar el tamaño.

En el núcleo no se han visto restos celulares ni bacterias sino que

eran una cantidad de mucopolisacáridos. En los cálculos formados en el colédoco se pueden ver núcleos de moco coloidal, MP, cobre e hierro, sobretodo en los pigmentarios (310). Se han evidenciado a veces hilos de sutura (311) y áscaris sobretodo en las zonas orientales e incluso trozos de metal (312) o una bala (313) formándo el núcleo de un cálculo pigmentario.

El cálculo de colesterol conglomerado se debe a aglutinación de cálculos de colesterol pequeños adheridos por mucopolisacáridos con posterior cohesión e incorporación del colesterol (107), así como pigmentos, sales de calcio y proteínas que le otorgan un caparazón duro.

Los cálculos múltiples y de igual tamaño se originan de la fragmentación de una masa antes de que el caparazón esté duro. Sobre estos focos se deposita pigmento y moco creciendo por aglutinación aunque también pueden hacerlo por depósito laminar. Estas glicoproteínas aisladas tienen capacidad de coagulación sobre las sales biliares. (86,87,107,228) Se piensa que los pelotones de moco son embebidos en la mucosa pero las expulsadas van contactándose entre sí y forman el primer rudimento de cálculo con forma de MORA (4) que con la aposición de sustancias crece.

Cuando existe infección esta morfología se modifica por los depósitos de calcio que se añaden y forman la LECHE DE CALCIO. Los grandes cálculos se recrystalizan en años y a veces sufren roturas o paradas bruscas. Incluso se han observado como canales de infiltración dentro del cálculo por donde contacta la bilis con el material del cálculo interaccionando entre sí químicamente. (21)

La aposición del calcio a los cálculos se influye por el calcio de la bilis. El contenido del mismo en la bilis coledociana es similar al sanguíneo mientras que en la VB es mucho más elevado debido a su paso activo a través de la secrección celular de la pared de la VB además de por la difusión.

Por observación directa o a microscopía electrónica del corte de un cálculo (314) o por estudios de difracción de rayos X (309) se han revelado



dos tipos de nucleación de los cálculos: una homogénea y otra heterogénea. La heterogénea puede favorecerse por la existencia de moco, sustancias proteicas, carbonato de calcio, bilirrubinato y bacterias (108,112) a partir de los cuales se deposita el resto del material. La homogénea se da en los cálculos puros de colesterol a partir de moléculas del mismo y sobre ello se añade colesterol en una bilis sobresaturada. En este tipo de cálculos, las medidas terapéuticas encaminadas a evitar la sobresaturación inhibirían la litiasis y favorecerían la disolución de las concrecciones existentes, mientras que en el caso heterogéneo no tendrían validez. (4,309)

V.- LITOGENESIS.

La formación de los cálculos es uno de los puntos más intrigantes de esta patología por el punto desconocido en el que se encuentra todavía. Como base de su patogenia se han involucrado de modo clásico a tres factores: la composición de la bilis; es estasis y la infección. Sin embargo hay que distinguir entre la litiasis por colesterol y por cálculos pigmentarios. Se van a revisar los mecanismos de producción de ambos de modo separado, dadas sus diferencias fundamentales.

#### 1) MECANISMO DE FORMACION DE CALCULOS DE COLESTEROL.

En base a los tres factores involucrados, HELLER elaboró en 1952 un esquema (FIGURA Nº 17) interrelacionándolos. (186) Según su teoría la morfología de cada cálculo nos da idea de su génesis. Los originados por inflamación tienen una forma concéntrica y estructura coloidal. Los de tipo cristaloides y forma radial no son causados por la inflamación.

##### 1. 1.- ALTERACION DE LA COMPOSICION DE LA BILIS.-

En los cálculos con colesterol es un factor importante la sobresaturación de la bilis en colesterol. Experimentalmente se ha visto que la bilis con saturación similar de colesterol en pacientes con o sin litiasis tienen diferente predisposición a formar cristales de colesterol cuando se realiza incubación in vitro. (315)

Cuando existe una sobresaturación muy elevada de más del 300% se produce una nucleación homogénea por condensación de moléculas de colesterol que actúan de modo primario. La nucleación heteroogénea necesita además de supersaturación aunque no tan elevada, la existencia de partículas nucleantes como el moco, bacterias, pigmentos, mucoproteínas y carbonato cálcico, etc.

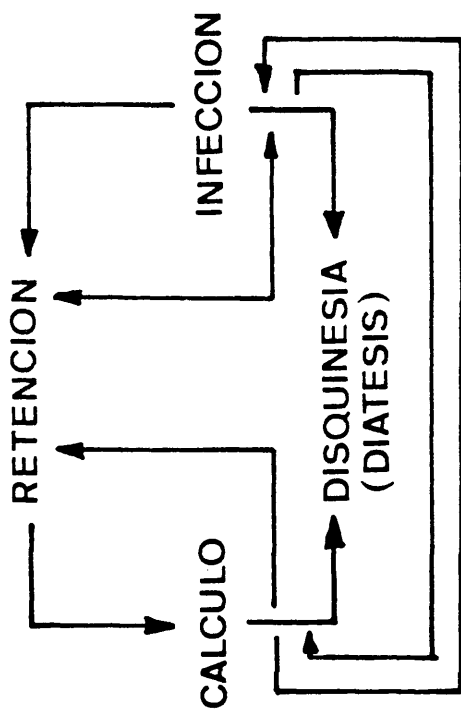


FIGURA Nº 17 .- Interrelación entre los factores considerados en la formación de los cálculos pigmentarios según la teoría de HELLER de 1952. ( 186 )

(316) Sin embargo la existencia de la sobresaturación no es factor válido único, sí es necesario para formar cálculos pues existen en personas sin ellos y con bilis patológica. La sobresaturación de solutos en la bilis por la simple extracción del agua no desencadena cálculos pero tampoco el estasis por la deshidratación que provoca sería respuesta a dicho problema. Parecen existir más factores protectores en estos casos que evitarían la formación de los cálculos. (307)

Cuando se sobresatura la bilis se forman microcristales de colesterol que serían el prerrequisito para el desarrollo posterior de la litiasis. Los motivos de la sobresaturación se han analizado en apartados anteriores (199). Los mecanismos existentes en condiciones normales para mantener al colesterol en solución en la bilis, fallan en estos pacientes y entonces los cristales de monohidrato quedan apositados y adheridos entre ellos, agrandándose la formación para dar concrecciones macroscópicas. (307) Este fenómeno de cristalización no ocurre en cálculos pigmentarios. (317,318) Tampoco se produce cuando sólo existe la sobresaturación sin cálculos por lo que se ha valorado la posibilidad de un denominado FACTOR NUCLEANTE O FACTOR DE NUCLEACION. Este factor está presente en la bilis litogénica o bien FACTORES INHIBIDORES de la nucleación en la bilis saturada en los individuos normales sin litiasis. (301)

GOLLISH en 1983 (308) estudió el tiempo de nucleación en la bilis humana con cálculos de colesterol. Observó que estando ambas sobresaturadas, la bilis hepática y de la VB es mayor el tiempo de nucleación en la última.

La disfunción de este factor no se modifica por el uso de diferentes índices de saturación del colesterol obtenidos por dilución de la bilis (319), por lo que se supone que un componente de naturaleza no lipídica puede estabilizar la bilis normal sobresaturada. (320) No existen diferencias entre los componentes lipídicos de bilis normal y anormal.

Se ha valorado la existencia de unos agentes favorecedores en potencia de la nucleación: bilirrubina, ácidos biliares, pigmentos biliares, bacterias, jabones cálcicos (291) y carbonatos (84,254,319), siendo el más tenido en

cuenta el moco o las glicoproteínas. (308) Aunque las proteínas biliares son en cantidad menor del 5% del contenido sólido biliar, son el segundo tipo más abundante después de los lípidos biliares.

Datos a favor de que exista un factor nucleante de origen proteico lo constituyen diversos experimentos:

1. Se ha visto que filtrando la bilis litogénica con un filtro AMICON XM-300 (319) no se elimina este factor, descartándose que lo sean los microcristales de colesterol.
2. Añadiéndose una pequeña cantidad de bilis (menos del 10%) con cálculos, en una VB con bilis normal se desencadena una rápida nucleación. (315,319) Otros trabajos demuestran el mismo hecho con otro tipo de soluciones de interés biológico. (321,322)
3. En los perros de la pradera se ha visto que se produce precipitación de cristales de monohidrato de colesterol al añadir glicoproteínas mucosas a la bilis. (291,301)
4. Extractos lipídicos complementados a la bilis no consiguen modificar el tiempo de nucleación de la bilis. (323)

No se ha podido excluir un mecanismo de acción indirecto en base a un factor nucleante que neutralice los factores antinucleantes fisiológicos existentes en la bilis normal, actuando como factor anti-antinucleante. (316,319) Estos factores antinucleantes se encontrarían de manera natural en la bilis hepática y de la VB evitando el depósito de colesterol en condiciones normales. En casos de enfermedad este inhibidor de la nucleación estaría ausente, bloqueado o inactivado. Parece que el factor nucleante tendría origen proteico. (323)

Se ha evidenciado, del mismo modo una mayor secreción de moco antes de la formación de los cálculos, en la VB y bilis, sugiriendo la importan-

cia que tiene en la producción de un precipitado posterior de colesterol.(86,87)

KLEEGERG (324,325) ha demostrado in vitro que se precipitaban las sales minerales dentro de una matriz coloide enfatizando la semejanza con la estructura laminar de los cálculos humanos.

El aumento del moco podría deberse sólo a una función concentradora de la VB provocada por el estasis pero no puede explicarse todo por ello, pues mientras los lípidos se concentran en un 170%, la hexosamina lo hace 447% en un experimento de DOTY. (42)

Los mucopolisacáridos (MP) actuarían como un material con fuerza de unión que serviría de entramado o andamiaje sobre el que se apondrían los constituyentes de los cálculos dotándolos de una estructura particular. (55,296,315,326) La afinidad de estas MP para ciertas sustancias como consecuencia de sus propiedades físicas y químicas pueden determinar la formación de un tipo específico de cálculos. (107)

Esta mucosustancia se encuentra en el núcleo de los cálculos y puede hacer que el cálculo crezca por incrementar la viscosidad de la bilis, el atrapamiento de los cristales en su red y así ir aumentando el entramado del cálculo. Las grandes moléculas glicoproteicas secuestrarían sales biliares desvirtuando la estabilidad en el equilibrio micelar (91) y actuando sobre las soluciones electroiónicas. (323) Con ello se formaría un complejo por el que se interacciona físicamente con los lípidos biliares, basándose en el comportamiento de las lipoproteínas séricas no siendo demostrado por todos los autores. (327,328)

Se mantienen la duda sobre si el efecto de las proteínas es por serlo en sí o por ser proteínas biliares. La falta de un efecto de la albúmina que se considera control experimentalmente supone que esos efectos de las proteínas biliares son específicas. La albúmina no demostró efecto inhibitor de la nucleación, a pesar de ser el principal componente de las proteínas biliares no pudiendo esperarse una relación entre tiempo de nucleación y proteínas totales biliares. (308)

Se ha emitido la hipótesis de que la bilis litogénica aumentaría la concentración mucoide de la VB facilitando la precipitación de microcristales de colesterol y la aflomeración de los mismos, produciendo un obstáculo a la salida de la bilis por el cístico y elevando la resistencia al vaciamiento, lo que conlleva a un estasis. Este círculo vicioso autoperpetuado culmina en la formación de concrecciones. (42)

Dadas las propiedades físicas elásticas y de viscosidad del moco impide el vaciamiento de cualquier cristal de colesterol intramural, promoviendo el conglomerado de cristales que se adhiere a la pared vesicular y el crecimiento del cálculo en la bilis se continúa por la continua aposición de cristales sobre los ya aglutinados. (43) Estos acúmulos del gel mucoso se han visto en humanos (107) y en perros de la pradera. (4,42,301)

ROSLYN (56) ha evitado el estasis al igual que la formación de cálculos mediante el lavado diario e inducción al vaciamiento de la VB con inyección de CCK-PZ. Otros como HUTTON (329) lo han hecho mediante esfinterotomía.

Como conclusión, se propone una secuencia de hechos. La alimentación con una dieta litogénica rica en colesterol, induce la secreción hepática de bilis litógena que continúa con concentraciones elevadas de colesterol. Ello actúa como un factor que estimula la secreción mucosa de la VB y que como agente nucleante favorece la precipitación de cristales de colesterol en el moco. Este gel mucoso se transformaría al adherirse a la pared en un conglomerado incluido en la bilis. Al adquirir un tamaño umbral obstruiría parcialmente el cístico, entorpeciendo el vaciado de la VB por aumentar la resistencia a la salida de la bilis. Esto conlleva a un estasis vesicular, medio ideal para activar la secreción del moco con más crecimiento del conglomerado cristalino, progresando hasta llegar al cálculo macroscópico. (42)

#### FASES DE LA FORMACION DE LOS CALCULOS DE COLESTEROL:

Según SMALL (316) existen 3 fases:

I.- Secreción de la bilis sobresaturada de colesterol por el hígado.



- II.- Nucleación y precipitación del exceso de colesterol de las micelas.
- III.- Retención y crecimiento con aglomeración de los cristales de monohidrato de colesterol hasta transformarse en concrecciones macroscópicas o cálculos.

Existen 3 fórmulas para este crecimiento del cálculo:

1º) La agregación de los cristales de modo sucesivo en láminas o cristales gruesos por la colocación ordenada y lenta de los microcristales (112). Se produce en casos de bilis muy sobresaturada, para lo cual la micela con el colesterol puede acercarse al conglomerado de cristales venciendo las fuerzas de repulsión y dejar allí el colesterol. Este hecho está determinado por las propiedades de la superficie del colesterol. Por último se aleja del cálculo por la velocidad debida al flujo biliar. (330)

2º) La unión de varios cristales de colesterol por fuerzas de cohesión adhiriéndose entre sí por nuevas moléculas. Este fenómeno es más rápido y desordenado, formando una masa deforme, esponjosa o porosa. Se produce en bilis altamente saturada por lo que la cristalización se hace masivamente.

3º) La unión de varios calculitos de pequeño tamaño con su núcleo de cristalización correspondiente transformándose después con aposición de sustancias encima de ellos. (112)

## 1. 2.- INFLAMACION.-

La inflamación y la infección de la VB se suelen encontrar frecuentemente en casos de colecistitis con colelitiasis. La invasión secundaria por

bacterias es lo más común, aunque puede darse de modo primario y alterar la función normal de absorción de la VB con concentración excesiva del colesterol.

Además la existencia de cuerpos extraños como bacterias, necrosis de la mucosa por inflamación, etc. pueden servir de nido a la nucleación. (20)

### 1. 3.- ESTASIS.-

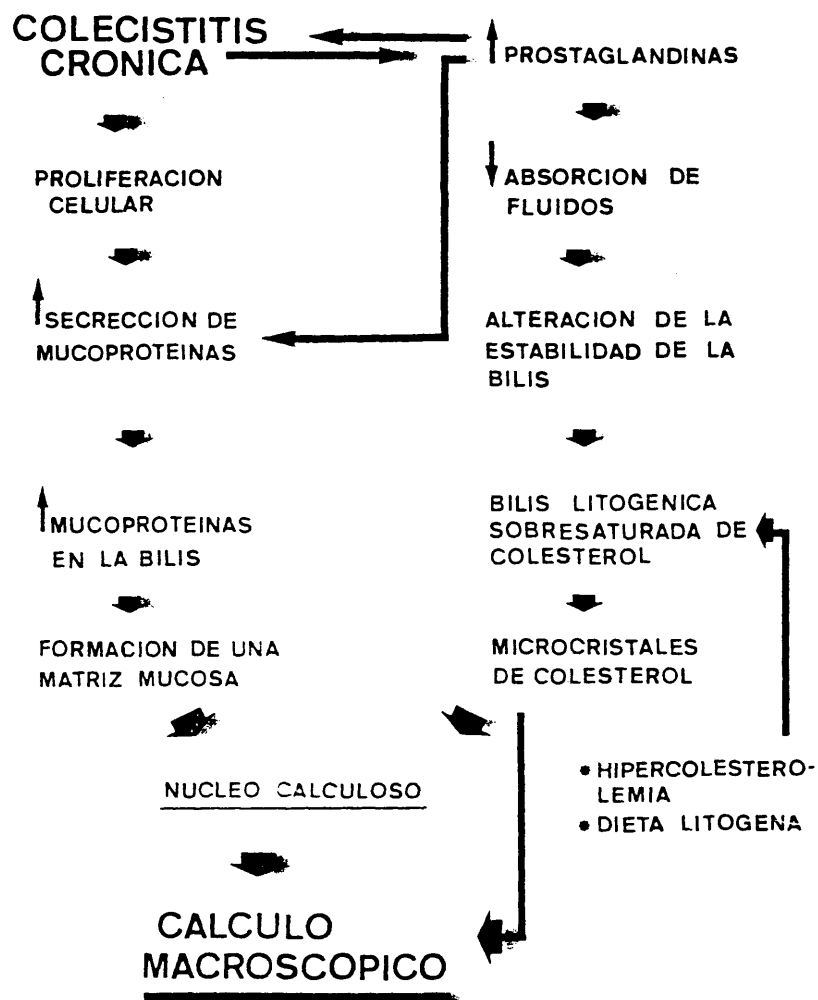
La oclusión a la salida de la bilis por una impactación de un cálculo puede predisponer a la infección bacteriana o aumentar la resorción del agua, alterando la estabilidad de la bilis por acúmulo de las MP procedentes del epitelio. Se favorece además la resorción selectiva de uno u otro constituyente dando un desequilibrio en su composición. (20)

Este estasis también se produce en casos raros de megavesícula que por deficitario vaciamiento produce un acúmulo del barro biliar en la parte más declive de la misma. (331)

La válvula de Heister influye también en el vaciamiento por lo que puede provocar estasis. (30)

Tras la realización de una duodenopancreatectomía, gastrectomía y en colecistitis o disquinesias de la VB aparecen cálculos por alterar el epitelio de la VB y por retención de la bilis. (186)

Basada en las diferentes teorías emitidas anteriormente en la revisión sobre el tema y en la de SJODAHL (84) se expresa en la FIGURA Nº 18 un mecanismo etiopatogénico de los cálculos de colesterol.



**FIGURA Nº 18.-** Teoría sobre la formación de los cálculos de colesterol basada en varias hipótesis expuestas en el texto.

## 2) MECANISMO DE FORMACION DE CALCULOS PIGMENTARIOS.

Los factores involucrados en la formación de los cálculos cuyo componente principal es el pigmento son:

### 2. 1.- AUMENTO EN LA CONCENTRACION DE BILIRRUBINA.-

Se sabe que el factor determinante en la formación de cálculos de pigmento o bilirrubinato es la concentración excesiva en la bilis de la bilirrubina no conjugada.

Este aumento puede producirse si existen hidrólisis anormal de la bilirrubina conjugada en la VB o una elevación de la producción de bilirrubina total en casos como la hemólisis. (332)

### 2. 2.- INFECCION.-

MAKI en 1966 (172) propone una hipótesis sobre la formación de la litiasis pigmentaria, aunque basada principalmente en la incidencia mayoritaria de este tipo de cálculos en los orientales.

Se basa en la infección de la VB. En condiciones normales la bilis es estéril (281) y sin embargo se han cultivado gran número de bacterias y hongos en el 5-70% de VB con cálculos. No se han visto diferencias con los tipo de litiasis y dado que el núcleo de los de colesterol es también pigmentario, la secuencia de hechos que conlleva a la nidación podría ser el mismo en ambos.

Se han cultivado Salmonella Típhi en el siglo XIX; estreptococo en el inicio del siglo XX y más recientemente E. Coli. (333,334)

En Oriente casi uniformemente la bilis se encuentra infectada por *E. Coli* (172) y parásitos como el *Ascaris*, *Actinomyces* y en caso de colengitis piógenas por el *Clonordis Sinensis*. El papel de estos parásitos no está muy claro. También se ha visto el *Propionibacterium Acnes* que es un contaminante de la piel semejante a los de *Actinomyces* en los cultivos. (335)

Una idea pudiera ser que estos parásitos produjeran una duodenitis y una emigración intracoledociana de los mismos causando papilitis que pudiera ser la responsable del desarrollo de los cálculos de bilirrubinato cálcico por el estancamiento de la bilis y la infección ascendente del sistema biliar. (336) Podrían servir también como núcleos sobre los que se desencadena la aposición de cristales. (217)

Los bacilos coliformes producen una enzima beta-glucouronidasa que hidroliza el diglucourónido de bilirrubina a bilirrubina libre, lo que precipita como bilirrubinato cálcico (91,114) Se inhibe por la glucaro 1-4 lactona derivada del ácido glucourónico. (87) Cuando se produce la infección se sobrepasa la inhibición de la beta-glucouronidasa, con lo que se realiza una deconjugación excesiva de la bilis. (172) (FIGURA Nº 19)

También en caso de infección se produce un exceso de la fosfolipasa A que es un componente normal de las secrecciones excesivas del páncreas y de la bilis de VB. Esta enzima produce transformación de la lecitina en lisolecitina y ácidos grasos. Si éstos se absorben por la mucosa de la VB habrá una alteración de la estabilidad micelar pudiendo precipitarse el colesterol en concrecciones en la bilis sobresaturada. (91)

En Occidente tales teorías son difíciles de aplicar porque es rara la litiasis complicada con infección biliar. Sí se ha observado una concentración elevada de bilirrubina no conjugada (159). En su solubilización intervienen 2 factores: el pH y los ácidos biliares. El pH normalmente es ácido como en la bilis infectada y se solubiliza menos. Cuando no existe taurocolato sucede lo mismo.

El papel de la VB no puede ocultarse pues la pared de la VB inflamada

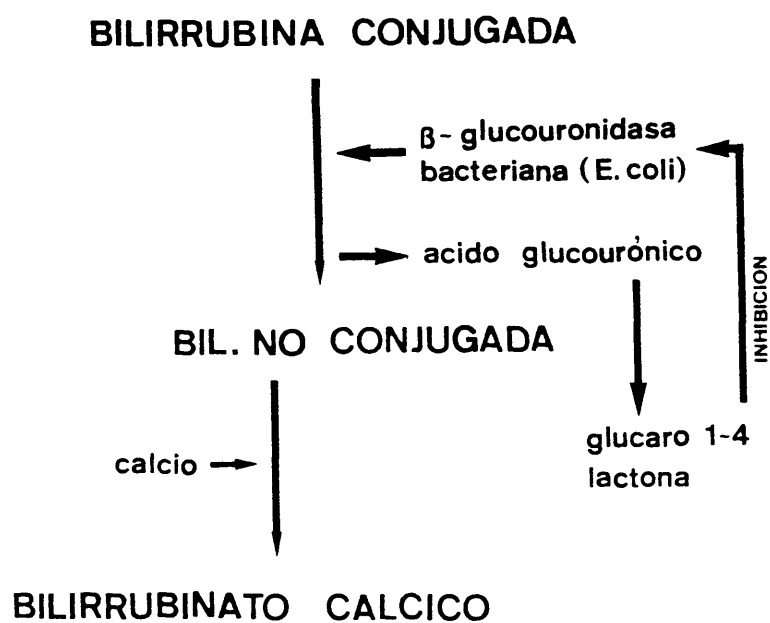


FIGURA Nº 19.- Esquema de la teoría de MAKI (172 ) sobre la formación de la litiasis pigmentaria y la acción de las bacterias como desencadenantes.

por la infección podría producir modificaciones físico-químicas y alteraciones del pH que favorecen la precipitación de las sales de calcio. (91,161)

## 2. 3.- ESTASIS.

La misma infección al producir una inflamación y edema del cuello de la VB y del cístico seguida de fibrosis (337), dificulta el vaciamiento de la VB llevando al estasis y alterando la función normal de la VB con la elevación de la presión intraluminal. La unión de colecistitis y oclusión del conducto cístico pueden llevar a una producción excesiva de moco con formación de mucocoele (107) y atrapamiento del pigmento en él junto a sales de calcio, fosfatos y carbonatos, con lo que se inicia el nido o núcleo de crecimiento del cálculo. (161,338,339)

El material mucoso proporcionaría un pH ácido capaz de llevar a la precipitación a las sales biliares, carbonato cálcico y bilirrubinato cálcico (107,167,320). Es más raro encontrar cálculos sólo producidos por el estasis y sin infección. (107, 340)

Este aumento de concentración mejora la solubilidad del calcio por el incremento de la zona micelar pero al mismo tiempo el estasis permite la precipitación por volver a la bilis sobresaturada o metastable.

El núcleo no podría salir de la VB y crecería en tamaño. La inflamación de la mucosa sumada al ataque que ésta sufre por las sales biliares, produce liberación de enzimas capaces de deconjugar la bilirrubina, los ácidos biliares e hidrolizar los fosfolípidos sumándose al resto de efectos ya producidos por las enzimas bacterianas.

La VB inflamada además podría reabsorber sus elementos de modo diferencial e incluso aumentarse la secreción del calcio. (168,341)

Una vez que se inicia la cristalización el pH puede elevarse dentro

del intersticio del cristal acumulándose materiales que no se precipitan normalmente como el aragonito, vaterita y fosfatos como la apatita. (339)

El crecimiento posterior se realiza por epitaxia o deposición de cristales sobre ese sustrato, así como metales pesados y magnesio. La forma de precipitación del carbonato cálcico varía según condiciones de pH. Así en pH ácido sería como calcita y en pH alcalino aragonito o vaterita. La vaterita puede convertirse en otras formas pero si permanece se convierte rápidamente en material cristalino o se estabiliza en otros componentes como carbonato de bario. (252,266,342)

#### DILUCION DE LOS CALCULOS.-

Debido al conocimiento experimental de que los cálculos se han disuelto en bilis de perro (91) se han intentado detectar sustancias para conseguirlo en humanos. (151)

Se han valorado la colestiramina, la lecitina, etc. pero el que tiene algún valor es el ácido quenoesoxicólico administrado oralmente. Ello favorece la solubilidad del colesterol y ejerce un efecto detergente directo. (91,151) Se ha ensayado últimamente el ácido ursodesoxicólico, válidos siempre que el cálculo contenga colesterol.

Tras el abandono del tratamiento se produce una recidiva calculosa muy elevada, por lo que no se puede pensar que esta sustancia no consiga corregir el defecto metabólico causante sino que lo suprime momentaneamente o lo oculta. (343)

En los cálculos pigmentarios no consigue la disolución y se han utilizado quelantes del calcio como el EDTA o el hexametafosfato de sodio. (161,344,345) La administración oral de ácido glutárico para aumentar la actividad del de la glucaro 1-4 lactona. (277)



- 136 -

También se están experimentando inhibidores de la cristalización del fosfato y del carbonato de calcio. (346,347)

La ingestión de agua se ha aconsejado como ayuda para prevenir el desarrollo de cálculos por la disminución de la concentración de la bilis de la VB, ayudando al vaciamiento de la misma y así evitar el estasis. (348,349)

HIPOTESIS.

La vesícula biliar ha sido estudiada bajo multitud de aspectos casi todos ellos morfológicos. Del mismo modo, los cálculos producidos en ellas se han analizado desde un punto de vista meramente estético o bien para determinar su composición pero nunca se han efectuado para relacionar estos datos entre sí.

Partiendo del hallazgo de un material de estructura proteiforme dentro de la matriz calcúlosa que originaría el núcleo de la concrección, se han ido practicando algunos estudios para aclarar la etiología química de dicha sustancia y su papel en la patogenia de la litiasis biliar como posible desencadenante del cálculo.

La introducción de técnicas histoquímicas válidas para la determinación de mucoproteínas ha revelado que este material puede tratarse de una glucoproteína y ha dotado de una amplia gama de posibilidades para su identificación y análisis en diferentes tejidos del organismo humano. Su aplicación en la vesícula biliar tanto en el humano como en animales de experimentación, ha mostrado la presencia de esta mucoproteína en forma de vesículas de tipo pinocitótico o gránulos, localizados en el interior de las células de la mucosa vesicular, cuando ésta era portadora de cálculos, y siempre precediéndolos en el tiempo.

Las glucoproteínas son sustancias de estructura química mixta que pueden producirse normalmente en casi todos los órganos del tracto digestivo, agudizándose e incrementándose su secreción en los estados inflamatorios patológicos. La inflamación mediante la liberación de intermediarios químicos como las prostaglandinas, provoca un aumento de la producción de sustancia mucoide en las células del epitelio de la vesícula biliar.

Todo lo anteriormente expuesto, condiciona una mayor producción de las mucoproteínas en la vesícula y su excreción a la bilis, originando el núcleo sobre el que se depositan otros materiales como el colesterol en sobresaturación, el pigmento, las sales de calcio, etc. dando lugar al cálculo definitivo. El crecimiento del mismo se debería a la sucesiva aposición en capas de dichos materiales.

Sobre la base de estos hechos se originó la hipótesis del presente trabajo. Su fundamento ha sido el estudio de las mucoproteínas producidas en las células de la mucosa de la vesícula biliar de 100 pacientes con litiasis biliar y el análisis de los cálculos correspondientes tanto desde un punto de vista cuantitativo como cualitativo.

En este sentido, los objetivos de la Tesis han sido:

- 1º) El estudio histoquímico mediante diferentes técnicas histológicas de la mucosa de la vesícula biliar, para determinar y cuantificar el grado de inflamación de su pared y la existencia de mucoproteínas, así como la identificación del tipo químico al que pertenecen y su localización específica a nivel celular.
- 2º) El análisis cristalográfico de los cálculos de las vesículas biliares, empleando técnicas de fragmentación de cristales y de lámina delgada, con la intención de clasificar el tipo de los mismos según su composición y como valoración cuantitativa y morfológica de los componentes químicos identificados.

## MATERIAL Y METODOS.

1) MATERIAL.-

## 1.- TOMA DE MUESTRAS.

### 1.1.- VESICULA.

Se han estudiado 100 piezas de vesícula biliar correspondientes a colecistectomías practicadas a pacientes intervenidos quirúrgicamente en la II Cátedra de Patología Quirúrgica del Hospital Clínico de "San Carlos" de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid durante los años 1983 y 1984.

En todos los casos las vesículas portaban cálculos. Tras la exéresis de la misma se practicaba la apertura por sección longitudinal según el eje mayor de la VB extrayéndose la bilis y los cálculos.

Las muestras para el análisis de la VB se tomaban de la zona del fundus dado que se considera que es la parte de la VB en que las reacciones histoquímicas se contemplan de modo más nítido. (43) La toma se hacía con un tamaño de 2x2 cm y se incluían posteriormente en solución de formaldehído neutro al 10% hasta su fijación y posterior inclusión en la parafina.

### 1.2.- CALCULOS.

Tras la apertura de la VB y en fresco se obtenían varios cálculos o en caso de ser único, los existentes, para el estudio de los mismos. La conservación se hacía en un recipiente y en refrigerados a una temperatura de - 10°C. Al mismo tiempo se anotaban color, número y tamaño de los cálculos de cada una de las VB.

Cuando se daba la coexistencia de coledocolitiasis se tomaba muestra

de estos cálculos para la realización de estudios complementarios no motivo de este trabajo.

## 2.- SUJETOS.-

Se han analizado los datos clínicos de cada uno de los 100 pacientes respecto a sexo, edad y tipo de patología asociada a la colelitiasis, de manera fundamental.

### 2.1.- SEXO.

De los 100 pacientes 23 (23%) correspondieron a varones y 77 (77%) a mujeres, encontrándose la relación de 3:1. (FIGURA Nº 20)

### 2.2.- EDAD.

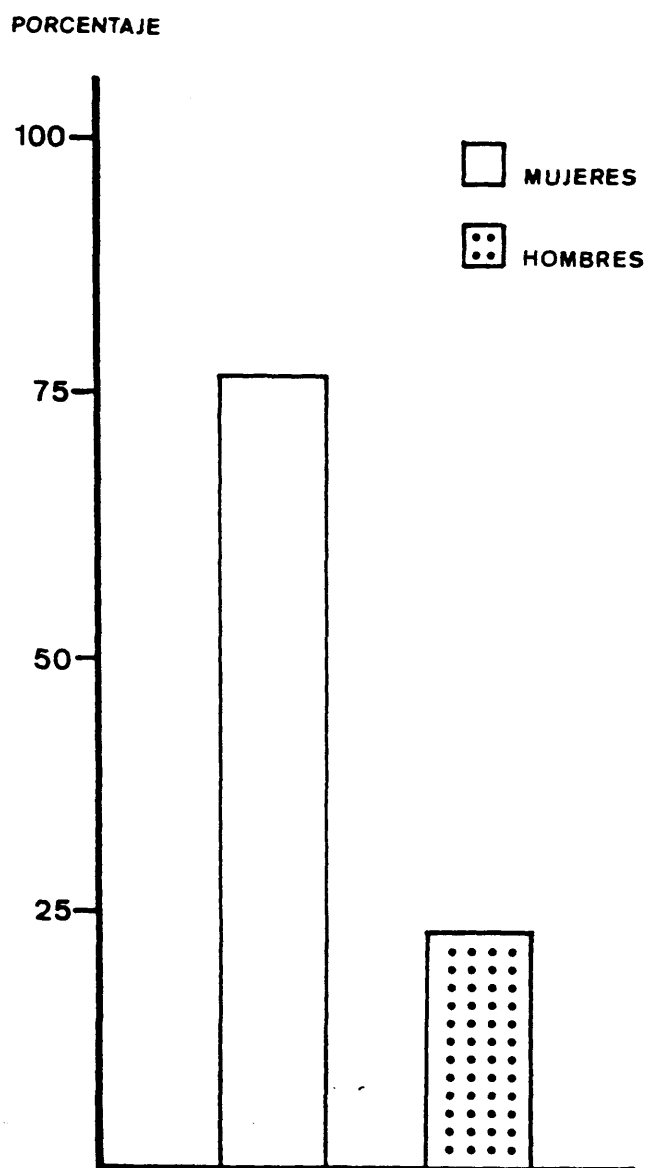
Osciló en un rango de 26 años a 87 años con una media estadística (x) de 54.3 años. La distribución por décadas de edad se muestra en la FIGURA Nº 21.

En el caso de los pacientes varones el rango de edad fue de 27-75 años con  $x=58.6$  años, algo más elevada que en la (x) general.

### 2.3.- PARIDAD.

En las mujeres se ha visto una paridad entre 0 y 7 hijos con media de 2 y moda de 3.





**FIGURA Nº 20.-** Distribución de la muestra de 100 pacientes según el sexo.

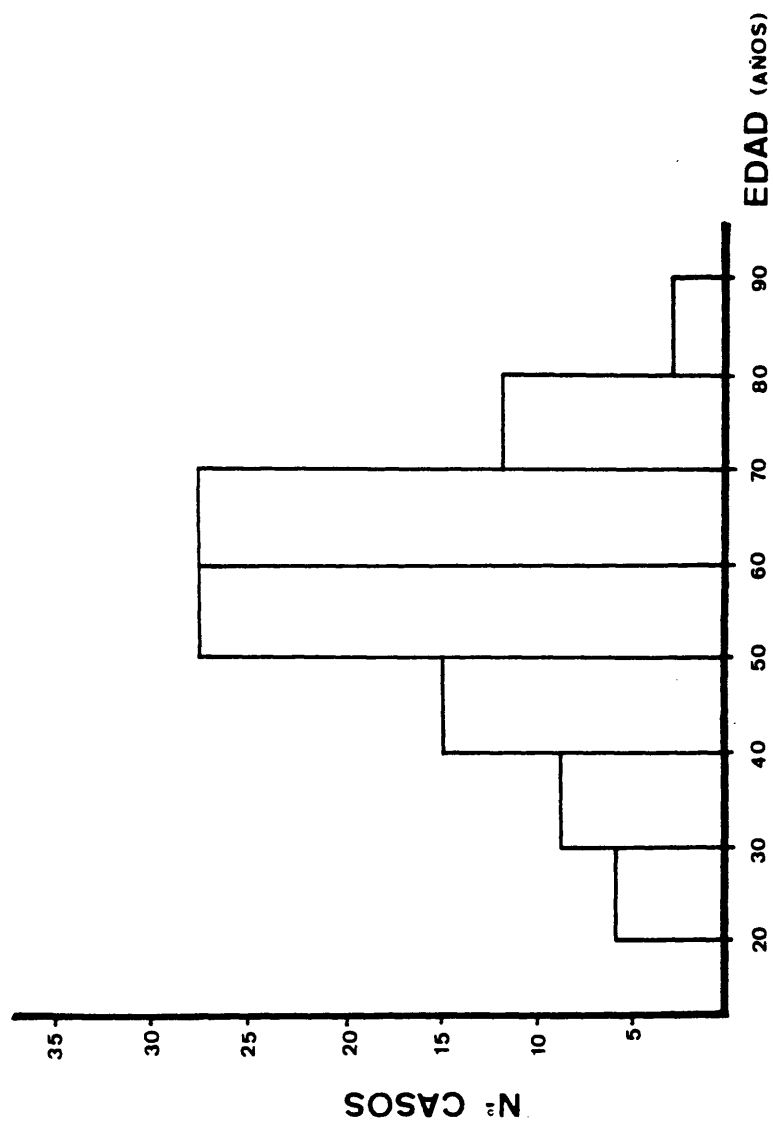


FIGURA Nº 21.- Distribución del número de casos según las décadas de edad.

#### 2.4.- ENFERMEDADES ASOCIADAS.

En el 63% de los pacientes se encontraron otras enfermedades asociadas y coexistentes son la colelitiasis. En 27% eran más de 2. Se destaca que en 23 pacientes había además coledocolitiasis y en 21 cirrosis hepática. La lista de enfermedades se expone en la TABLA Nº IV.

Se hallaron en total 115 enfermedades en los 100 pacientes lo que corresponde al 63%, dado que en varios se soportaba más de 1.

ENFERMEDADES ASOCIADAS	Nº	PORCENTAJE
HEPATOPATIA CRONICA Y CIRROSIS	22	19
DIABETES MELLITUS	10	8.6
OBESIDAD SEVERA	3	2.6
PANCREATITIS AGUDA Y/O CRONICA	13	11.3
HIDATIDOSIS HEPATICA	4	3.4
ULCUS DUODENAL	8	6.9
HERNIA DEL HIATO	4	3.4
HEMORRAGIA DIGESTIVA ALTA	3	2.6
DIVERTICULOSIS COLONICA	2	1.7
COLON ESPASTICO	1	0.8
CANCER DE RECTO	1	0.8
ANEMIA	5	4.3
TROMBOPENIA IDIOPATICA	1	0.8
HIPERBILIRRUBINEMIA	13	11.3
TRASTORNOS LIPIDICOS	2	1.7
GOTA	1	0.8
HIPERTENSION ARTERIAL	1	0.8
LITIASIS RENAL	4	3.4
INFECCION URINARIA	1	0.8
POLQUISTOSIS RENAL	1	0.8
ADENOMA PROSTATICO	1	0.8
FEOCROMOCITOMA	1	0.8
FIBRILACION AURICULAR	2	1.7
INSUFICIENCIA MITRAL. MARCAPASOS.	1	0.8
EMBOLISMO PULMONAR	1	0.8
PLEURITIS	2	1.7
SINDROME POSTFLEBITICO	1	0.8
ARTROSIS	1	0.8
CANCER DE OVARIO	1	0.8
CANCER DE MAMA	1	0.8
BOCIO NODULAR	1	0.8
ENFERMEDAD DE PARKINSON	1	0.8
ESQUIZOFRENIA	1	0.8

**TABLA Nº IV.-** Relación de las enfermedades asociadas a la  
a la colelitiasis en los 100 enfermos que com-  
ponen la muestra estudiada.

## II) METODOS.-

## 1.- MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA VB.-

### 1. 1.- TECNICAS HISTOLOGICAS.-

Tras la toma e inclusión en parafina se obtuvieron cortes seriados de 5 micras de grosor preparándolos para las tinciones posteriores. (37) Se han practicado además de los métodos considerados habituales como la Hematoxilina Eosina (HE) o el ácido peryódico de SCHIFF (PAS) otros de tipo histoquímico específicos para determinar mucoproteínas en la mucosa de la VB, siguiendo un esquema basado en unas modificaciones de H.C. COOK (287) expresado en la FIGURA Nº 22.

#### - HEMATOXILINA EOSINA.

Se han practicado los siguientes pasos para su realización según la técnica standard:

1. Desparafinar la pieza de manera convencional.
2. Tinción con hematoxilina de CARAZZI durante 10 minutos.
3. Lavado con agua durante 10 minutos.
4. Teñido con eosina durante unos segundos.
5. Lavado con agua.
6. Deshidratación hasta alcohol absoluto por sucesivos pases de alcoholes.
7. Montaje según técnica habitual.

Con este método se valoran los parámetros indicadores de lesión morfológica que sufre la VB y por ende su grado de inflamación.

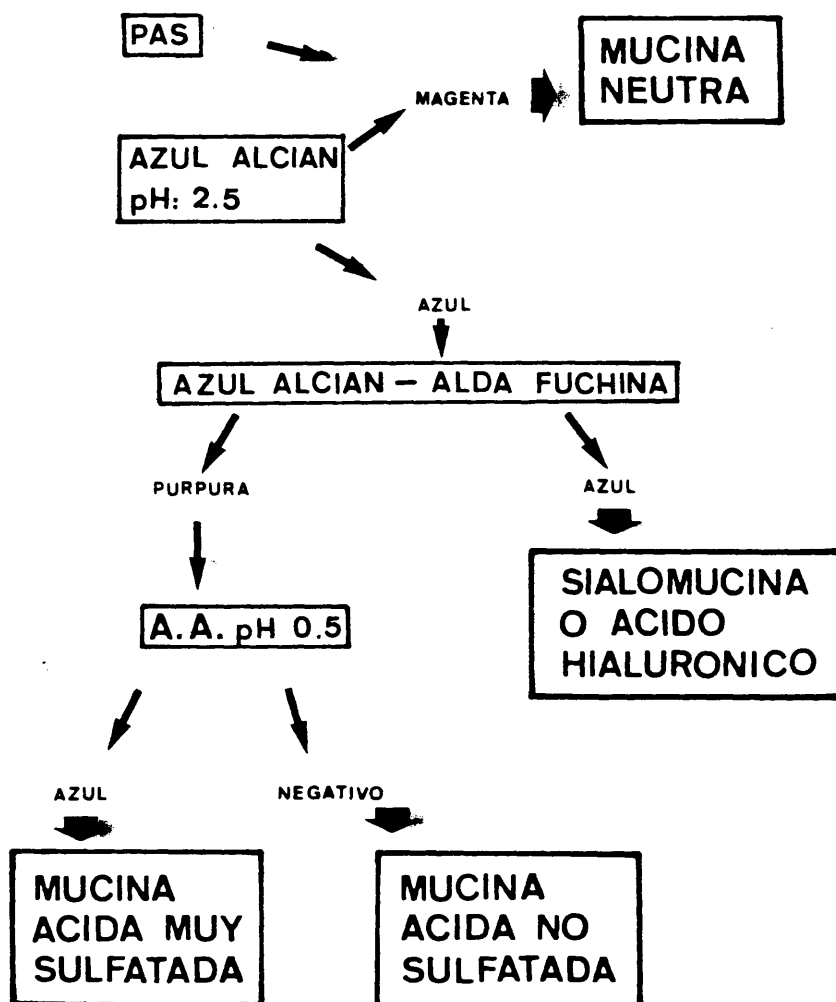


FIGURA Nº 22.- Esquema utilizado para la realización de técnicas histoquímicas encaminadas a descubrir y tipificar las mucoproteínas tisulares. Modificado de COOK.

- P.A.S.

Sirve para tinción de mucinas neutras que son (+) al PAS mientras que las ácidas pueden teñirse o no. Las muy sulfatadas y el ácido hialurónico son PAS (-). Las sialomucinas son (+) (287)

La técnica consiste en:

1. Desparafinar e hidratar.
2. Tinción con ácido peryódico al 0.5% durante 10 minutos.
3. Lavado con agua corriente durante 10 minutos.
4. Leucofuchina durante 8 minutos.
5. Bisulfito sódico al 2% durante 3 minutos.
6. Lavado con agua corriente unos 10-15 minutos.
7. Contrastar con hematoxilina de CARAZZI durante 3 minutos.
8. Lavado con agua.
9. Deshidratación por pases de alcohol hasta el absoluto.
10. Montaje habitual.

- AZUL ALCIAN PH= 2.5.

Tiñe las mucinas ácidas en azul y diferencia incluso subtipos. (287)

Se puede también valorar la cantidad de mucinas según la intensidad de la tinción sea leve o fuerte.

La realización es la siguiente:

1. Desparafinado.
2. Introducción en ácido acético 3% durante 3-5 minutos.
3. Tinción con azul alcian unos 30 minutos.
4. Lavado con agua corriente.



5. Aplicación de hematoxilina acética unos 5 minutos
6. Lavado con agua.
7. Deshidratación y montaje.

- AZUL ALCIAN PH= 0,5.

Se utiliza para diferenciar mucinas ácidas muy sulfatadas de las no sulfatadas, (303,350) contrastando con el rojo neutro la tinción celular.

La técnica se practica así:

1. Desparafinar e hidratar.
2. Introducción en AA a pH=0.5 previamente preparado y acidificado por ácido clorhídrico N/5 durante 30 minutos.
3. Lavado en agua.
4. Contrastar con rojo neutro al 0.5% unos 3 minutos.
5. Lavado con agua.
6. Deshidratación y montaje.

- ALDEHIDO- FUCHINA CON AZUL ALCIAN PH=2,5.

Sirve para identificar glicoproteínas muy sulfatadas no tiñéndose las neutras. (43)

La realización es la siguiente:

1. Desparafinado.
2. Hidratar hasta alcohol de 70%.
3. Aldehído fuchina durante 20 minutos.

4. Lavado en alcohol de 70°.
5. Lavado en agua.
6. AA al 1% en ácido acético 3% unos 5 minutos.
7. Lavado con agua.
8. Deshidratar hasta alcohol absoluto.
9. Aclarar y montar.

#### 1. 2.- CONTROLES.-

Se han obtenido 5 muestras de VB sana que ha sido extirpada quirúrgicamente por motivos distintos, siendo utilizadas para control de los estudios tincionales realizados.

#### 1. 3.- VALORACION DE LOS RESULTADOS.-

##### • LESION MORFOLOGICA:

La valoración de la lesión o cambios morfológicos e histológicos y por ende de los factores determinantes de la llamada colecistitis crónica, se han practicado tras el análisis al microscópio óptico de la tinción en cada una de las 100 muestras con la HE.

Se han cuantificado 10 parámetros: fibrosis; atrofia; metaplasia; colesteroles; cálculos incluido o microcálculos en la luz; senos de RA; senos de L; infiltración celular de linfocitos; infiltración de células plasmáticas; infiltración por diversas células y otros hallazgos.

El grado de afectación en cada uno de ellos se ha determinado desde

el negativo (-) cuando no se encontraba dicho factor hasta positivo de + a ++++ según intensidad de la presencia.

Así mismo se ha catalogado la alteración según la capa de la VB afectada denominándose del siguiente modo:

- 0 = mucosa
- 1 = submucosa
- 2 = muscular
- 3 = serosa

NAHRWOLD (48) ha clasificado este tipo de hallazgos en 3 grados siendo 0 el que corresponde a un grado de colecistitis crónica leve cuando no existe ninguno de estos datos patológicos; 1 o moderada si existen varios y 2 o severa si son más de 3 ó 4. Este tipo de denominaciones sin embargo no se ha utilizado en el presente trabajo.

Con el método y denominaciones antes expuesto se ha obtenido un número de 14 dígitos correspondiendo cada número a cada uno de los siguientes parámetros: el primero a la presencia de cálculos incluidos; el segundo a atrofia de vellosidades; el tercero a atrofia de epitelio; el cuarto a metaplasia; el quinto a colesterosis; el sexto a fibrosis de la submucosa; el séptimo fibrosis de la capa muscular; el octavo de la serosa; noveno a presencia de senos de RA; el décimo a senos de L; el undécimo a células inflamatorias en la submucosa; duodécimo de la muscular; decimotercero de la serosa y el decimocuarto a otros hallazgos.

Según si la alteración correspondiente existía o no se denominaba 1 o 0. En algunos como la fibrosis, atrofia e inflamación además podía oscilar desde el 0 al 4 según fuese -, +, ++, +++ ó ++++.

La suma completa de todos los números que componen el número de 14 dígitos nos da el grado de modificaciones histológicas de la VB pudiendo oscilar en un rango de 0 si es nula a un máximo de 38.

- EXISTENCIA DE MUCOPROTEINAS:

Con la técnica del PAS así como con las 3 técnicas histoquímicas planteadas se ha valorado tanto la existencia de positividad en la tinción como el grado de la misma que plasma además de la cualidad de la MP, su cantidad presente en las células de la mucosa de la VB.

El análisis de los resultados se ha esquematizado del siguiente modo:

- PARTE DE LA VB AFECTADA: según sea:

ER: epitelio de revestimiento

GL: glándulas.

SRA: senos de RA.

SL: senos de L.

- DISPERSION DE LA TINCION: cuando la observación se fija de el aspecto general que presenta toda la mucosa o ARQUITECTURA (AR) o sólo en una célula (CELU)

Dentro de la valoración celular puede ser del polo apical o mundial (PM) o del total de la célula (TO). Esta diferenciación se basa en que las variaciones tintoriales se producen en el polo mundial de modo primordial y nunca en el basal por lo que se ha omitido éste del estudio, calificándose cuando se analiza la célula en su totalidad.

A su vez dentro de la AR puede presentarse un patrón difuso de tinción (D) a todas las células de la mucosa o bien sólo de unas de modo focal (F).

En el caso de la CELU también se denomina (D) cuando se tiñe de modo difuso o (G) si granular o localizada.

- INTENSIDAD DE LA TINCION:

Se califica desde 1 a 3 según la tinción fuese leve, intensa o muy intensa con la técnica de que se trate.

Con todos estos datos se ha elaborado una tabla incluyendo los exámenes de las 4 técnicas (PAS, AA pH=2.5; AA pH=0.5 y ALDA-FUC) y con todos los resultados se ha determinado el tipo de MP existente y la cantidad de ellas en cada muestra de VB basada en la positividad o negatividad a cada técnica y oscilando del 1 al 3 en el segundo caso.

La evaluación de posesión de los diferentes tipo de MP en mucoproteínas de tipo neutro (MN), ácidas muy sulfatadas (MAMS) o poco sulfatadas (MAPS) se ha hecho con arreglo al siguiente esquema tincional:

- si PAS (+) contiene MN.
- Si AA pH= 2.5 (+) y AA pH=0.5 (+) contiene MAMS.
- Si AA pH= 2.5 (+) y ALDA-FUC (+) y AA pH= 0.5 (-) contiene MAPS.

Se tiene en cuenta la denominación SUMA como suma de la cantidad de mucinas en cada estrato de VB estudiado y TOTAL DE MUCINAS como la suma de todas las mucinas en los 4 estratos celulares analizados.

Según la cualidad y combinación de los 3 tipos de mucinas encontrados en cada capa se ha catalogado la capa con una letra siguiendo la nomenclatura expuesta en la TABLA N<sup>o</sup> V.

MN	MAMS	MAPS	TIPO VB
-	-	-	A
+	-	-	B
+	+	-	C
+	-	+	D
+	+	+	E
-	+	+	F
-	+	-	G
-	-	+	H

TABLA Nº V. - Denominaciones de las capas de la VB según el tipo de MP que contengan.

## 2.- METODOS DE ESTUDIO DE LOS CALCULOS.- =====

### 2.1. ANALISIS MACROSCOPICO.-

Se valora el número de cálculos, tamaño, forma y coloración externa de los cálculos encontrados en las 100 VB que componen la muestra. Se ha concretado el estudio a 1 ejemplar de cada caso pues se consideran homogéneos todos los cálculos incluidos en una misma VB y con una composición similar. (351)

### 2. 2.- ESTUDIO DIRECTO TRAS FRAGMENTACION.-

El cálculo se fractura digitalmente con presión o bien por sección del mismo, observándose sus características de coloración externa e interna, forma de partirse, si su estructuración es homogénea y/o laminar, su distribución de las capas si existen y su color interno al corte.

Se utiliza para la visualización la lupa o estereomicroscópio que alcanza de 50-60 aumentos. (Tipo ZEISS STEMISR 50x)

Mediante este estudio se clasifican los cálculos en 3 tipos: de colesterol, pigmento o mixtos (comunes o de combinación ) (248) según la morfología externa y tras la fragmentación:

1. COLESTEROL: si son amarillo tanto externa como internamente al fragmentarse.
2. PIGMENTO: si son negros en superficie y al partirlos presentan aspecto negruzco y homogéneo.
3. MIXTOS Y DE COMBINACION: si son de color oscuro, marrón por fuera

y al abrirlos presentan alternancias de coloración amarillentas y marrones más oscuras. Los de combinación se caracterizan porque dicha alternancia en bandas es casi perfecta de una capa amarilla y otra marrón.

### 2.3.- ANALISIS MICROSCOPICO.-

Se realiza tras introducción del cálculo en resina de poliuretano para su homogeneización y fijación. Se corta después el bloque con un microtomo en secciones de unas 30 micras colocándose sobre un porta de cristal sobre el que se monta de modo similar a una preparación histológica. Esta técnica se denomina de LAMINA DELGADA.

Posteriormente cada preparación se visualiza al microscopio de luz polarizada tipo ZEISS ULTRAPHOT - 2, usándose algunos aditamentos en como los nicoles cruzados (nicoles de turmalina) o el compensador de lámina de yeso (rojo de primer orden) para mejor determinación de los elementos a analizar. Dichos estudios se han practicado en el Departamento de Geología y Geoquímica de la Facultad de Ciencias(Universidad Autónoma de Madrid.)

El cálculo previa a la imbuición en la resina sufre un proceso de deshidratación o secado en cual pierde peso pero no se modifican sustancialmente ni el número ni la distribución de sus componentes.

Mediante la microscopía óptica se ha realizado el estudio cuantitativo por una parte y el morfológico por otra.

#### TECNICA DE CONTAJE, VALORACION DE LA COMPOSICION. =====

El análisis cuantitativo se ha realizado por la técnica denominada de CALCULO DE AREAS obteniéndose por un porcentaje de cada uno de los compo-



nentes por apreciación visual macroscópica en la observación. Se practica el recuento de 100 cristales en  $1 \text{ mm}^2$ . Cada uno de los componentes ha sido identificado por sus características geológicas:

- COLESTEROL:

Es un cristal que puede presentarse como monohidrato de colesterol o tras la desecación convertirse en su forma anhidra siendo estructuras muy similares, salvo en la forma de cristalización. En el primer caso lo hace en el sistema triclinico y en el segundo en el monoclinico, siempre anisótropo. es de color amarillo claro o blanco aunque en ocasiones se tiñe de pigmento por fuera alterándose parcialmente el color. La forma del cristal es la de un prisma rectangular oblicuo con uno de sus vértices truncados tal como se ha mostrado en la FIGURA Nº 12-A. Da colores de interferencia en tonos azules verdosos con la luz modificada por los nicoles cruzados.

- CARBONATO CALCICO:

Es también un cristal aunque su forma es romboédrica tipo anisótropo. La cristalización es diferente según las 3 formas de presentación: la calcita, aragonito y vaterita. Con la luz de los nicoles cruzados da una coloración rosada-anaranjada y de una apariencia puntual. El aspecto del cristal se muestra en la FIGURA Nº 12-B.

- PIGMENTO:

Es de estructura amorfa no constituyendo cristales. Da colores oscilantes entre las gamas del amarillo, rojo, marrón o verde, según la concentración del espesor del depósito. Con el uso de la luz de nicoles cruzados da coloración totalmente marrón.

- SUSTANCIAS AMORFAS:

Existen materiales amorfos, a veces incluso cristales que no se han logrado identificar por este tipo de métodos. Aparecen como de color negro entre los cristales, existiendo una cierta duda de que correspondan a moco, sangre desecada u otras sustancias en cantidades mínimas residuales. No se han podido llegar a identificar exactamente con este método.

Para la clasificación microscópica de los cálculos tras el recuento de los diversos componentes se ha utilizado la clasificación de BOCKUS de 1976 (199) en el que se utiliza el contenido en colesterol como agente delimitante y que se expuso en la TABLA Nº III.

#### ESTUDIO MORFOLOGICO. =====

Se ha estudiado también con el microscopio y mediante la técnica de lámina delgada la conformación del cálculo en su interior, la colocación de los cristales y de los diferentes componentes. En algunas ocasiones se ha hecho uso de técnicas especiales como los nicoles cruzados o la lámina de rojo de primer orden para determinar específicamente la estructura microscópica y conformación espacial del cálculo y en los diferentes tipos de cálculos.

### 3.- ANALISIS ESTADISTICO.-

Tras la obtención de los diferentes datos sobre la histología de la mucosa y las determinaciones de mucoproteínas así como de los cálculos se realizó una primera aproximación estadística relacionándose varios factores entre sí.

El análisis ha partido de los datos obtenidos de los cambios hitológicos, determinación y cuantificación de los 3 tipos de MP, y composición de los cálculos valorándose el colesterol, bilirrubinato, carbonato cálcico y sustancia residual.

El nivel de significación elegido para el contraste de hipótesis ha sido de 0.05. Se ha realizado un estudio estadístico descriptivo en las variables cuantitativas, determinándose la media, desviación típica, error estandar y rango.

La relación entre variables se ha estudiado mediante el coeficiente de correlación bivariada de Pearson.

En las variables en las que se ha determinado la existencia de correlación, se han realizado diferentes regresiones (lineal, logarítmico, exponencial y polinómica) contrastándolas y eligiendo la más adecuada por contraste de hipótesis.

## RESULTADOS.

1.- ESTUDIO HISTOQUIMICO DE LA VB.-

#### 1.- ANALISIS DE LOS CAMBIOS HISTOLOGICOS.-

Los resultados obtenidos del estudio histológico con la técnica de la HE en las 100 VB estudiadas y que componen la muestra se exponen en la TABLA Nº VI.

Se incluyen los hallazgos morfológicos de los cambios sufridos por ellas cuando portaban cálculos, expresándose mediante 10 parámetros. Al final se expone el número de 14 dígitos que resume todos ellos de modo numérico y su suma. Cuanto más elevado sea el número de la suma, mayor cantidad de cambios histológicos (CH) comporta.

En 11 VB no pudieron tenerse en cuenta sus datos por detectarse una técnica de HE incorrecta en algún punto y en 2 casos por presentar un adenocarcinoma asociado que perturbaba o alteraba los hallazgos.

Se han analizado los factores por separado:

##### - CALCULOS INCLUIDOS:

Los cálculos incluidos o microcristales en la luz vesicular se han evidenciado en un número pequeño de VB; sólo en 18 casos (20.2%) . Indica la etapa precoz de la formación calculosa.

##### -ATROFIA:

Es uno de los signos más importantes representativos de la alteración morfológica que sufre la VB por lo que la colecistitis crónica y su grado dependen en buena parte de ella.

Se ha visto más importantemente en las vellosidades que en el epitelio donde se ha podido evidenciar en 62 casos (69.6%) frente a 28 (31%) del epitelio. En 27 casos (30.3%) no se encontró ningún signo de atrofia.

TABLA N° VI..- Resultados del estudio histológico de microscopía con el método de HE para analizar las modificaciones que sufren las VB con cálculos.

Nº VB.	CALCULOS INCLUIDOS	ATROFIA	META- PLASIA	COLESTE- ROLOSIS	FIBROSIS	SRA	SL	LINFOCITOS	PLASMATICAS	OTROS	Nº CH	TOTAL CH
1	-	VEL +++ EP +++	-	-	3 ++	-	-	1 + 2 + 3 +	-	-	03400002 001110	12
2	-	VEL +++ EP +	-	-	1 +++ 2 +++ 3 +++	+	-	-	-	-	01300333 100000	14
3	+	VEL ++ EP -	+	-	-	+	-	1 +++	-	-	10210000 103000	8
4	-	VEL + EP -	-	-	3 +++	+	-	1 ++	-	EOS +++ 0123 104440	00100003 104440	17
5	-	VEL - EP -	-	-	2 + 3 ++	+++	-	1 ++	1 ++	NEUT 1 + NEUT 1 +	00000012 112000	7
6	-	VEL - EP -	+	+	-	+++	-	-	-	-	00011000 100000	3
7	-	VEL - EP -	-	++	-	+	-	-	-	-	00001000 100000	2
8	-	VEL +++ EP +++	+	-	-	++	+	0 ++ 3 +	0 +	-	03310000 112010	12
9	+	VEL ++ EP -	-	++	0 +	++	-	-	-	-	10201100 100000	6
10	-	VEL - EP -	+	+	-	-	-	-	-	-	00011000 100000	2
11	-	VEL - EP -	+	-	-	++	-	1 ++	1 +	-	00010000 102000	4
12	-	VEL - EP -	-	+++	1 + 2 + 3 +++	+	-	1 + 2 + 3 +	1 +	EOS +++ 123	00001113 101110	10



Nº VB.	CALCULOS INCLUIDOS	ATROFIA	META- PLASIA	COLESTE- ROUSIS	FIBROSIS	SRA	SL	LINFOCITOS	PLASMATICAS	OTROS	Nº CH	TOTAL CH
13	NO	VALIDA									10	
14	-	VEL - EP -	+	-	3 +	++	-	1 +	-	-	00010001 111000	5
15	NO	VALIDA									11	
16	-	VEL + EP -	-	-	1 + 3 +	++	-	-	-	-	00100101 100000	4
17	-	VEL ++ EP -	-	-	3 ++	++	-	1 +	1 +	-	00200002 101000	6
18	-	VEL +++ EP +++	-	-	1 +++ 2 + 3 +++	-	-	1 +	-	-	03300313 101000	15
19	-	VEL ++ EP -	+++	-	-	++	-	-	-	-	00210000 100000	4
20	-	VEL ++ EP +	-	-	3 +	++	-	3 +	-	-	01200001 100010	6
21	-	VEL - EP -	-	-	-	++	+	1 ++ 3 +	1 +	-	00000000 112010	5
22	-	VEL + EP +	-	+++	3 +	+	-	-	-	-	00101001 100000	4
23	-	VEL ++ EP -	+	+	3 +	++	-	1 + 3 +	-	-	00211001 111010	9
24	+	VEL +++ EP +++	-	-	1 + 2 + 3 +++	+	-	1 + 2 + 3 +++	3 +	HIST 3+++ C.C. XANTOG.	13300113 111131	20

[illegible]

Nº VB.	CALCULOS INCLUIDOS	ATROFIA	META- PLASIA	COLESTÉ- ROLOSIS	FIBROSIS	SRA	5L	L INFOCITOS	PLASMATICAS	OTROS	Nº CH	TOTAL CH
37	NO	VALIDA									10	
38	+	VEL ++ EP -	-	-	1 + 3 ++	+	-	1 ++ 2 ++ 3 ++	1 ++	EOS 123 +	10200102 102220	13
39	-	VEL +++ EP +++	-	-	1 + 2 ++ 3 ++	+	-	1 + 2 ++ 3 ++	1 + 2 +	EOS 12 + HIST 12 + C.GIG 1 +	03300112 101101	14
40	-	VEL +++ EP +++	+	-	1 + 2 ++ 3 +++	++	-	1 ++ 2 ++ 3 ++	1 + 2 + 3 +	EOS 1+ 2++ HIST 12 + C.GIG 1 +	03310123 102221	21
41	+	VEL - EP -	+	-	3 +	+	-	3 +	-	-	10100100 100010	5
42	-	VEL + EP -	-	-	1 +	+	-	3 +	-	-	00100100 100010	4
43	-	VEL - EP -	-	-	-	+	-	-	-	-	00000000 100001	2
44	+	VEL +++ EP +++	-	-	1 + 2 +	+	-	1 + 3 +	-	-	13300110 101010	12
45	-	VEL - EP -	-	-	-	+	-	3 +	-	-	00000000 101010	3
46	-	VEL - EP -	+	-	-	++	-	-	-	-	00010000 100000	2
47		VEL +++ EP +++	-	-	1 ++ 3 ++	+	-	1 + 3 +	1 + 3 +	-	03300202 101010	13
48		VEL +++ EP -	+	-		++	-	1 + 2 + 3 +	1 + 2 + 3 +	EOS 123 +	00310100 101110	9

Nº VB.	CALCULOS INCLUIDOS	ATROFIA	META- PLASIA	COLESTE- ROLOSIS	FIBROSIS	SRA	SL	LINFOCITOS	PLASMATICAS	OTROS	Nº CH	TOTAL CH
49	-	VEL +++ EP +++	-	-	1 +++ 2 +++ 3 +++	-	-	-	-	CALCIFICADA	03400444 000001	20
50	+	VEL +++ EP -	+	-	1 ++ 2 +++ 3 +++	+	-	1 ++ 2 ++ 3 ++	1 +++ 2 ++ 3 ++	NEUT 1+ C.GIG 1+ C.AGUOA -	10310233 102221	21
51	-	VEL + EP -	+	-	-	+	-	3 +	-	-	00110000 100010	4
52	-	VEL + EP -	-	-	-	+	-	-	-	-	00100000 110000	3
53	-	VEL - EP -	-	-	3 +	+	-	1 +	-	-	00000001 111000	4
54	-	VEL - EP -	-	-	1 + 2 + 3 ++	+	-	1 ++ 2 +	1 +	EOS 1 +	00000112 102100	8
55	-	VEL ++ EP -	+	++	-	+	+	1 +	-	-	00211000 111000	7
56	+	VEL ++ EP -	+	-	1 + 2 + 3 +++	+	++	1 ++ 2 ++ 3 ++	1 ++ 2 ++ 3 ++	EOS 123 + ENDARTERITIS MOROFAGOS Y FE.	10210113 112221 00000000 100000	18
57	-	VEL - EP -	-	-	-	+	-	-	-	-	00010000 101010	4
58	-	VEL - EP -	+	-	-	+	-	1 + 3 +	-	-	12110001 111010	10
59	+	VEL ++ EP +	+	-	3 +	+	-	1 + 3 +	-	-	00000100 110000	3
60	-	VEL - EP -	-	-	1 +	++	-	-	-	-	00000100 110000	3

Nº VB.	CALCULOS INCLUIDOS	ATROFIA	META- PLASIA	COLESTE- ROLOSIS	FIBROSIS	SRA	SL	LINFOCITOS	PLASMATICAS	OTROS	Nº CH	TOTAL CH
61	-	VEL + EP -	+	+	-	+	-	-	-	-	00111000 100000	4
62	-	VEL ++ EP +	-	-	3 +	-	-	1 + 3 +	-	-	01200001 101010	7
63	-	VEL - EP -	+	-	2 + 3 ++	+	-	2 +	-	-	00010012 100120	8
64	-	VEL - EP -	-	-	3 +++	+	+	1 +++ 3 +++	1 ++	-	00000003 113030	11
65	-	VEL + EP -	+	-	3 +	+	-	1 ++ 3 +	1 +	-	00110001 102010	7
66	-	VEL ++ EP -	+	-	3 +	+	+	1 +	-	-	00210001 111000	7
67	-	VEL +++ EP -	+	-	-	+	-	1 + 3 +	-	-	00310000 111000	8
68	-	VEL ++ EP -	-	-	1 + 2 ++	+	+	1 + 2 ++ 3 ++	1 +	HIST 1 ++ 2 + 3 +	00101120 101211	10
69	+	VEL +++ EP ++	+	-	1 + 2 +++ 3 +++	++	-	1 +++ 2 + 3 +	1 +	C.GIG 3+++ MORFAGOS Y FE. C.C.XANTOG.	12310133 103111	21
70	+	VEL +++ EP ++	+	-	1 + 2 + 3 +	+++	-	1 ++ 2 + 3 +	1 +	-	12310111 112110	16
71	-	VEL - EP -	+	-	-	++	-	3 +	-	-	00010000 110010	4
72	+	VEL +++ EP -	+	-	1 +	++	-	3 ++	-	-	10310100 100030	10

Nº VB.	CALCULOS INCLUIDOS	ATROFIA	META- PLASIA	COLESTE- ROLOSIS	FIBROSIS	SRA	SL	LINFOCITOS	PLASMATICAS	OTROS	Nº CH	TOTAL CH
73	+	VEL +++ EP +++	-	-	1 +++ 2 +++ 3 +++	-	-	1 +++ 2 +++ 3 +++	1 +++ 2 +++ 3 +++	EOS 12 + NEUT 123 + C.GIG 1 +	13300333 003330	25
74	-	VEL - EP -	+	-	-	++	-	1 +	-	-	00001000 101000	3
75	-	VEL ++ EP ++	-	-	-	-	-	1 +	-	-	122000001 101000	6
76	-	VEL + EP -	+	-	-	+	-	1 ++ 2 + 3 +	1 +	-	00110000 102110	7
77	+	VEL +++ EP +	+	-	1 + 3 +	++	+	1 ++ 2 ++ 3 ++	1 ++ 2 +	-	11310101 112220	16
78	-	VEL +++ EP +++	-	-	1 + 2 + 3 +	-	-	1 + 2 + 3 +	-	-	03300111 1001110	12
79	-	VEL +++ EP +++	+	-	1 ++ 2 ++ 3 ++	-	-	3 +	-	-	03310222 100000	14
80	-	VEL - EP -	+	+++	-	+	-	2 + 3 +	-	-	00011000 100110	5
81	+	VEL ++++ EP ++++	+	-	1 ++++ 2 + 3 ++	-	-	2 ++ 3 ++	-	-	14410412 100220	22
82	-	VEL +++ EP +++	-	-	1 + 2 + 3 ++	-	-	-	-	-	03300112 000000	9
83	-	VEL ++++ EP ++++	-	-	1 ++ 2 + 3 ++	-	-	1 + 2 + 3 +	1 + 2 + 3 +	-	04400212 001110	16
84	-	VEL ++++ EP ++++	-	-	1 ++++ 2 ++++ 3 ++++	-	-	2 ++ 3 ++	-	ESCLEROSADA	04400444 100221	26

[illegible]

[illegible]



El rango de afectación osciló entre 0-4 con  $x = 2.9$  en el epitelio y,  $x = 2.3$  en la vellosidad.

En las VB en las que se afectaba el epitelio, su atrofia tenía mayor intensidad que en la vellosidad, afectándose ésta por tanto de modo más frecuente pero menos intenso.

- METAPLASIA:

Estuvo presente en 45 VB (50.5%) en más o menos grado, mostrando un cierto grado de degeneración de la mucosa como consecuencia de las transformaciones morfológicas de la inflamación. El tipo de metaplasia encontrada ha sido de tipo antral en el 100%.

- COLESTEROLOSIS:

Se ha visto en 14 casos (15.7%) con un grado de afectación media de 1.6 con un rango de 1-3.

- FIBROSIS:

Corresponde a uno de los datos más importantes presentes en la mucosa de la VB con cálculos. Se ha manifestado en 62 (69.6%) y no se encontró en las otras 27 (30.3%).

En la mucosa sólo se encontró en 1 caso y presentando un grado leve de +.

En general la fibrosis afecta más a las capas serosa, submucosa y muscular por orden de frecuencia. En la submucosa se vió en 40 (44.9%) con afectación  $x = 1.6$ . En la muscular en 29 casos (32.5%) con  $x = 1.7$  y en la serosa en 54 muestras (60.6%) con  $x = 1.9$ .

- SENOS DE ROCKITANSKY-ASCHOFF:

La presencia de estos senos no se da en todas las VB. Cuando existe traduce un grado de alteración que se ha encontrado en 63 casos (70.7%) con la HE. Si se buscan con el resto de los métodos se encuentran en 90 (90%) dado que cabe la posibilidad de no haber captado su existencia en un corte histológico pero sí en otros.

Tanto el número de SRA de una VB como la intensidad de afectación del mismo no se han tenido en cuenta por no considerarlos determinantes en la alteración histológica de la VB litiásica.

- SENOS DE LUCHKA:

Ocurre de modo similar al caso de los SRA. Con la HE se han evidenciado en 19 VB (21.3%) y con el conjunto de técnicas en 26 (29.2%), siendo más escasos o raros los SL que los SRA como demuestran las cifras.

- INFILTRACION CELULAR:

La infiltración celular de la pared de la VB muestra sea el tipo que sea, un grado inflamatorio de la VB, habiendo variaciones según las células encontradas.

a) Infiltración por linfocitos: es demostrativa de una inflamación crónica y se ha visto presente en 69 VB (77%) afectándose la mucosa en 1 caso con una intensidad de 2 (++)

La submucosa se ha infiltrado en 53 casos ( 59%) con  $x = 1.5$  como media de afectación. La muscular en 32 (35.9%) con  $x = 1.3$  y la serosa en 43 (48.3%) y  $x = 1.4$ . Es evidente que se afecta de modo más intenso la submucosa.

b) Infiltración por células plasmáticas: se ha encontrado en 30 (33.7%) afectándose a mucosa en 1 ocasión en grado 1; la submucosa en 27 (30.3%) con

x= 1.5; la muscular en 11 (12.3%) con x= 1.5 y la serosa en 9 casos (10.1%) con x= 1.4.

c) Infiltración por eosinófilos: se ha incluido en el apartado de otros hallazgos debido a que se ha producido en pocos casos. En 15 VB (16.8%) se vió su existencia en la mucosa con x= 4; en 11 (12.3%) en la submucosa con x= 1.6; en la capa muscular en 13 (14.6%) y 10 en la serosa (11.2%) con media de 1.7.

d) Infiltración de neutrófilos: indica inflamación más aguda y se ha observado en 5 VB (5.6%) con afectación en todas ellas de la submucosa y x= 1.2. En la muscular y serosa se afectaron 1 caso en cada una con x= 1.

#### - OTROS HALLAZGOS:

a) Presencia de histiocitos: ha sido vista en 6 VB (6.7%) y en la submucosa en todas con x= 1.6; en la muscular se afectaron 2 (2.2%) con x. 1.2 y 2 la serosa y x= 2.

b) Presencia de células gigantes: se encontraron en 6 casos (6.7%) y x=1. En la serosa. La serosa se encontraron en 1 caso (1.1%) con x= 3.

c) Varios: se encontraron otra serie dispar de hallazgos minoritarios tales como:

- colecistitis crónica xantogranulomatosa en 7 (7.8%).
- VB esclerosada en 1 (1.1%)
- calcificación de la pared en 1 (1.1%)
- colecistitis aguda y crónica en 1 (1.1%)
- edema de vellosidades en 1 (1.1%)
- endarteritis con macrófagos llenos de hierro en 2 (2.2%)
- cristales de colesterol en la submucosa en 3 (3.3%)

De la suma de todos estos factores en cada muestra de VB se ha obteni-

do un número que será mayor cuanto más afectación histológica presente.

El rango de esta afectación ha oscilado entre 1-26 siendo el máximo teórico alcanzable 38. La  $\bar{x}$  ha resultado baja pues ha sido de 9.40 con desviación estandar de 6.14. (TABLA Nº VII)

En general la afectación de la VB a nivel de CH ha sido pequeña. en 58 casos (65.1%) se encontró entre 1-10 o leve; en 22 (14.7%) fue moderada entre 10-20; grave entre 20-30 en 8 VB (8.9%) y ninguna presentó más de 30 como total de CH.

#### VB CONTROLES.

Habiendo practicado la técnica de la HE en las VB consideradas como normales, no se ha encontrado ningún factor patológico de los vistos en el resto de las VB que sí presentaban cálculos. Por tanto se han podido considerar esas 5 VB como controles normales respecto a las 100 muestras analizadas.

	RANGO	x	DESVIACION
SUMA ER	1 - 9	3.77	1.84
SUMA GL	0 - 9	4.77	2.18
TOTAL MP	1 - 24	11.69	5.26
TOTAL CH	1 - 26	9.40	6.14
SUMA MN	0 - 12	4.45	1.93
SUMA MAMS	0 - 9	2.44	2.43
SUMA MAPS	0 - 9	4.77	2.15
COLESTEROL	7 - 92	54.6	19.77
BILIRRUBINATO	5 - 90	41.72	18.88

TABLA Nº VII.- Datos estadísticos sobre el análisis de las MP  
en las 100 VB estudiadas, y otros datos más.

## 2.- ANALISIS DE LAS MUCOPROTEINAS.-

Los resultados que se han determinado tras la realización de las 4 diferentes técnicas histoquímicas encaminadas para descubrir las MP en las células de la mucosa de la VB con cálculos que conforman la muestra a estudio se describen en la TABLA Nº VIII.

Se exponen los resultados según cada una de las técnicas:

### 2.a.- ESTUDIO CON PAS.-

La muestra válida ha sido de 95 VB puesto que en 5 casos la técnica poseía alguna incorrección que hizo no incluirlas en el estudio.

#### 2.a.1.- VISION ARQUITECTURAL: (AR)

Bajo la observación de la preparación de la mucosa desde un punto de vista arquitectural de toda ella se encuentran los siguientes resultados:

- ER: en éste se encuentra una distribución tintorial de tipo difuso afectando la mucosa toda en general en 68 casos (71.5%) con una intensidad tipo 1 en 44 (46.3%) ; en el grado 2 en 18 VB (18.9%) y grado 3 en 6 (6.3%). Esta tinción leve se ha visto también en los casos con colesterosis como se observa en la FIGURA Nº 23.

Una afectación de tipo focal se ha reconocido en 27 VB (28.4%) con 21 (22.1%) de grado 1 de intensidad; 4 (4.2%) de tipo 2 y 2 (2.1%) de grado 3.

- GL: esta observación en las glándulas ha mostrado una tinción más frecuente e intensa adoptando una coloración magenta muy oscura. (FIGURAS Nº 24 y 25)

TABLA Nº VIII.- Resultados del estudio histoquímico de las  
VB en los 4 métodos utilizados y los ha-  
llazgos referidos a las MP y sus tipos.

Nº VB.	PAS AR CELU -- PM TO	AZUL 2.5 AR CELU -- PM TO	AZUL 0.5 AR CELU -- PM TO	ALD-FUC AR CELU -- PM TO	MN	MAMS	MAPS	TIPO	SUMA	TOTAL	MP
1	ER D1 G1 -	F1 D1 -	F1 G1 -	F1 G1 -	1	1	1	E	3	4	
	GL D1 G1 -	F1 D1 -	- - -	- - -	1	0	0	B	1	-	
	SR - - -	- - -	- - -	- - -	0	0	0	A	0	-	
	SL - - -	- - -	- - -	- - -	0	0	0	A	0	-	
2	ER F1 G1 -	F1 G1 -	- - -	F1 G1 -	1	0	1	D	2	7	
	GL F1 G1 -	F1 G1 -	- - -	F2 G2 -	1	0	2	D	3	-	
	SR D1 G1 -	F1 G1 -	- - -	F1 G1 -	1	0	1	D	2	-	
	SL - - -	- - -	- - -	- - -	0	0	0	A	0	-	
3	ER F1 G1 -	D1 G2 -	- - -	D1 G1 -	1	0	1	D	2	11	
	GL D2 G2 -	F2 - D3	F1 G1 -	F1 G2 -	2	2	2	E	6	-	
	SR - - -	D1 G2 -	- - -	D1 G1 -	1	0	1	D	2	-	
	SL F1 G1 -	- - -	- - -	- - -	1	0	0	B	1	-	
4	ER D2 G2 -	F2 G2 -	F2 G2 -	F3 G3 -	2	2	3	E	7	17	
	GL D2 G2 -	F2 G2 -	F1 G1 -	F2 G2 -	2	2	2	E	6	-	
	SR D2 G2 -	F2 G2 -	- - -	F2 G2 -	2	0	2	D	4	-	
	SL - - -	- - -	- - -	- - -	0	0	0	A	0	-	
5	ER D1 G1 -	D2 G2 -	F1 G1 -	D2 G2 -	1	1	2	E	4	15	
	GL D1 G1 -	D2 G2 G3	F1 G1 -	D2 G2 -	1	2	2	E	5	-	
	SR D2 G2 -	D2 G2 -	F1 G1 -	D2 G2 -	2	2	2	E	6	-	
	SL - - -	- - -	- - -	D2 G2 -	0	0	0	A	0	-	
6	ER F1 G1 -	D1 G1 -	F1 G1 -	F1 G1 -	1	1	1	E	3	8	
	GL F1 G1 -	D1 G1 -	F1 G1 -	F1 G1 -	1	1	1	E	3	-	
	SR F1 G1 -	D1 G1 -	- - -	F1 G1 -	1	0	1	D	2	-	
	SL - - -	- - -	- - -	- - -	0	0	0	A	0	-	
7	ER D1 G1 -	D1 G1 -	- - -	D1 G1 -	1	0	1	D	2	7	
	GL D1 G1 -	D1 G1 D3	F1 G1 -	D1 G1 -	1	1	1	E	3	-	
	SR D1 G1 -	D1 G1 -	- - -	D1 G1 -	1	0	1	D	2	-	
	SL - - -	- - -	- - -	- - -	0	0	0	A	0	-	
8	ER F2 G1 -	F3 G1 D2	- - -	D2 G2 -	2	0	3	D	5	12	
	GL D2 - G3	F2 - D3	- - -	F3 G2 -	2	0	3	D	5	-	
	SR F1 G1 -	F1 G1 -	- - -	F1 G1 -	1	0	1	D	2	-	
	SL - - -	- - -	- - -	- - -	0	0	0	A	0	-	
9	ER F1 G1 -	F1 G1 -	- - -	F1 G1 -	1	0	1	D	2	6	
	GL F1 G1 -	F1 G1 -	- - -	F1 G1 -	1	0	1	D	2	-	
	SR F1 G1 -	F1 G1 -	- - -	F1 G1 -	1	0	1	D	2	-	
	SL - - -	- - -	- - -	- - -	0	0	0	A	0	-	
10	ER D1 G1 -	F2 G1 -	F2 G2 -	D2 G2 -	1	2	2	E	5	11	
	GL D1 G1 -	F2 G1 -	F2 G2 -	D3 G3 -	1	2	3	E	6	-	
	SR - - -	- - -	F1 G1 -	D2 G2 -	0	0	0	A	0	-	
	SL - - -	- - -	- - -	- - -	0	0	0	A	0	-	
11	ER D2 G2	D3 D1 G1	- - -	F3 G2 D3	2	1	3	E	6	20	
	GL D3 -	G3 F2 -	G3 F1 G1	F3 G2 D3	3	2	3	E	8	-	
	SR F3 -	G2 F2 G1	G3 - - -	F3 G2 -	3	0	3	D	6	-	
	SL - - -	- - -	- - -	- - -	0	0	0	A	0	-	
12	ER D2 G1 -	D1 G2 -	- - -	D1 G1 -	2	0	1	D	3	8	
	GL D2 G1 -	D1 G2 -	- - -	D1 G1 -	2	0	1	D	3	-	
	SR D1 G1 -	D1 G2 -	- - -	D1 G1 -	1	0	1	D	2	-	
	SL - - -	- - -	- - -	- - -	0	0	0	A	0	-	
13	ER F1 G1 -	D1 G1 -	- - -	D1 G1 -	1	0	1	D	2	7	
	GL D1 G1 -	D1 G2 -	F1 G1 -	D1 G1 -	1	1	1	E	3	-	
	SR D1 G1 -	D1 G1 -	- - -	D1 G1 -	1	0	1	D	2	-	
	SL - - -	- - -	- - -	- - -	0	0	0	A	0	-	
14	ER F2 G2 -	F1 G1 -	- - -	F3 G2 -	2	1	3	E	6	22	
	GL D3 G2	D3 D2 -	G3 F1 G1	D2 G2 -	3	2	2	E	7	-	
	SR D2 G2 -	D2 -	G3 F1 G1	D2 G2 -	2	2	2	E	6	-	
	SL D2 G1 -	D1 G2 -	- - -	D1 G1 -	2	0	1	D	3	-	



Nº	VB.	PAS				AZUL 2.5				AZUL 0.5				ALD-FUC				MN	MAMS	MAPS	TIPO	SUMA	TOTAL	MP
		AR		CELU		AR		CELU		AR		CELU		AR		CELU								
		--	PM TO	--	PM TO	--	PM TO	--	PM TO	--	PM TO	--	PM TO	--	PM TO	--	PM TO							
15	ER	D3	G3	-	F1	G1	-	-	-	-	F2	G3	-	3	0	2	D	5	22					
	GL	D3	G3	-	F1	G1	-	F1	G1	-	F3	G3	-	3	1	3	E	7	-					
	SR	D3	G3	-	F1	G1	-	F1	G1	-	F2	G2	-	3	1	3	E	7	-					
	SL	D3	G3	-	-	-	-	F1	G1	-	-	-	-	3	0	0	E	3	-					
16	ER	D1	G1	D3	D1	G1	D3	-	-	-	D1	G1	D3	1	0	1	D	2	6					
	GL	D1	G1	-	D1	G1	D3	-	-	-	D1	G1	D3	1	0	1	D	2	-					
	SR	D1	G1	-	D1	G1	-	-	-	-	D1	G1	-	1	0	1	D	2	-					
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	D	0	-					
17	ER	D1	G1	-	D1	G2	-	-	-	-	D1	G2	-	1	0	1	D	2	6					
	GL	D1	G1	-	D1	G2	-	-	-	-	D1	G2	-	1	0	1	D	2	-					
	SR	D1	G1	-	D1	G2	-	-	-	-	D1	G2	-	1	0	1	D	2	-					
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-					
18	ER	D2	G2	-	F1	G2	-	F1	G1	-	F2	G1	-	2	1	2	E	5	10					
	GL	D2	G2	-	F1	G2	-	-	-	-	F1	G1	-	2	0	1	D	3	-					
	SR	D2	G2	-	F1	G2	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0	B	2	-					
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-					
19	ER	D3	G3	-	D1	G1	-	-	-	-	-	-	-	3	0	0	B	3	12					
	GL	D3	-	D3	D2	G1	D3	F2	G3	-	-	-	-	3	2	2	E	7	-					
	SR	D2	G1	G1	D1	G1	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0	B	2	-					
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-					
20	ER	D1	G2	-	D1	G2	-	-	-	-	D1	G1	-	1	0	0	D	2	6					
	GL	D1	G2	-	D1	G2	-	-	-	-	D1	G1	-	1	0	0	D	2	-					
	SR	D1	G2	-	D1	G2	-	-	-	-	D1	G1	-	1	0	0	D	2	-					
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-					
21	ER	D1	G1	-	D1	G1	-	-	-	-	D1	G2	-	1	0	0	D	2	10					
	GL	D2	G2	-	D1	G1	D3	F2	G2	-	D1	G2	D3	2	2	2	E	5	-					
	SR	D1	G1	-	D1	G1	-	F1	G1	-	D1	G2	-	1	1	1	E	3	-					
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D1	G3	D3	0	0	0	A	0	-					
22	ER	D1	G1	-	D1	G1	-	-	-	-	D1	G1	-	1	0	0	D	2	6					
	GL	D1	G2	-	D1	G1	-	-	-	-	D1	G1	-	1	0	0	D	2	-					
	SR	D1	G1	-	D1	G1	-	-	-	-	D1	G1	-	1	0	0	D	2	-					
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D1	G1	-	0	0	0	A	0	-					
23	ER	D1	G1	-	D1	G2	-	F1	G1	-	D1	G2	-	1	1	1	E	3	12					
	GL	D1	G1	-	D2	G2	D3	F1	G2	-	D1	G3	-	1	2	2	E	4	-					
	SR	D1	G1	-	D1	G2	-	F1	G1	-	D1	G1	-	1	1	1	E	3	-					
	SL	D1	G1	-	D1	G2	-	-	-	-	D1	G1	-	1	0	0	D	2	-					
24	ER	F2	G2	-	-	F1	G1	-	-	-	D1	G2	-	2	0	0	B	2	7					
	GL	F2	G2	-	-	-	-	-	-	-	D1	G2	-	2	0	0	B	2	-					
	SR	F1	G1	-	-	-	-	-	-	-	D1	G1	-	1	0	0	B	1	-					
	SL	D2	G2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0	B	2	-					
25	ER	D3	G3	-	F1	G1	-	-	-	-	D1	G1	-	3	0	0	D	4	16					
	GL	D3	G3	-	D3	G3	D3	F2	G3	-	D2	G3	-	3	2	2	E	8	-					
	SR	D2	G3	-	D1	G3	D3	-	-	-	D2	G3	-	2	0	0	D	4	-					
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-					
26	ER	D2	G3	-	F3	G3	-	F1	G1	-	D2	G2	-	2	3	3	E	8	15					
	GL	D2	G3	-	F1	G3	-	F1	G1	-	D2	G2	-	2	1	2	E	5	-					
	SR	D2	G3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0	B	2	-					
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-					
27	ER	D2	G2	-	D2	G1	-	F2	G1	-	D2	G1	-	2	2	2	E	6	16					
	GL	D2	G2	-	D2	G1	-	F1	G1	-	D2	G1	-	2	2	2	E	6	-					
	SR	D2	G2	-	D2	G1	-	-	-	-	D2	G1	-	2	0	2	D	4	-					
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-					
28	ER	F2	G1	-	F1	D2	-	F1	G1	-	F2	G3	-	2	1	2	E	5	10					
	GL	D3	G3	-	F1	D2	-	-	-	-	F2	G3	-	3	0	2	D	5	-					
	SR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-					
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-					

Nº VB.	PAS														MN	MAMS	MAPS	TIPO	SUMA	TOTAL	MP
	AR CELU		AZUL 2.5		AZUL 0.5		ALD-FUC														
	--	PM TO	--	PM TO	--	PM TO	--	PM TO													
29	ER	F1 G2	-	D1 G2	-	-	-	F1 G1	-	1	0	1	D	2	12						
	GL	D2 G2	-	D2 G3	-	F1 G2	-	D2 G2	-	2	2	2	E	6	-						
	SR	D1 G2	-	D1 G2	-	-	-	D2 G2	-	1	0	2	D	3	-						
	SL	D1 G2	-	D1 G2	-	-	-	-	-	1	0	0	B	1	-						
30	ER	D2 G2	-	D2 G1	-	F2 G1	-	D2 G2	D3	2	2	2	E	6	13						
	GL	D2 G2	-	D2 G1	-	-	-	D2 G2	D3	2	0	2	D	4	-						
	SR	F1 G1	-	D2 G1	-	-	-	D2 G2	-	1	0	2	D	3	-						
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-						
31	ER	D1 G1	-	D1 G1	-	-	-	D1 G1	-	1	0	1	D	2	8						
	GL	D1 G1	-	D1 G2	-	-	-	D1 G1	-	1	0	1	D	2	-						
	SR	D1 G1	-	D1 G1	-	-	-	D1 G1	-	1	0	1	D	2	-						
	SL	D1 G1	-	D1 G1	-	-	-	D1 G1	-	1	0	1	D	2	-						
32	ER	D1 G1	-	D1 G1	-	F2 G2	-	D1 G1	-	1	2	1	E	4	13						
	GL	D2 G2	-	D1 G1	-	F2 G1	-	D2 G2	-	2	2	2	E	6	-						
	SR	D1 G1	-	D1 G1	-	F1 G1	-	D1 G1	-	1	1	1	E	3	-						
	SL	-	-	D1	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-						
33	ER	F1 G1	-	F1 G1	-	F1 G1	-	-	-	1	1	0	C	2	14						
	GL	D2 G2	-	D2 G2	D3	F1 G1	-	-	-	2	2	2	E	6	-						
	SR	D2 G2	-	D2 G2	D3	F1 G2	-	-	-	2	2	2	E	6	-						
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-						
34	ER	D1 G2	-	D1 G2	-	-	-	D1 G1	-	1	0	1	D	2	8						
	GL	D2 G3	-	D1 G2	-	F1 G2	-	D3 G3	-	2	1	3	E	6	-						
	SR	D1 G1	-	D1 G2	-	F1 G1	-	D1 G1	-	1	1	1	E	3	-						
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-						
35	ER	NO VALIDA																			
	GL																				
	SR																				
	SL																				
36	ER	F1 G1	-	F1 G1	-	-	-	F1 G1	-	1	0	1	D	2	6						
	GL	F1 G1	-	F1 G1	D3	F1 G1	-	F1 G1	-	1	1	1	E	3	-						
	SR	F1 G1	-	F1 G1	-	-	-	-	-	1	0	0	B	1	-						
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-						
37	ER	D1 G1	-	F1 G1	D3	F1 G3	-	F1 G1	-	1	1	1	E	3	8						
	GL	D1 G1 G3	-	F1 G1	D3	F1 G1	-	F1 G1	-	1	1	1	E	3	-						
	SR	D1 G1	-	F1 G1	-	-	-	F1 G1	-	1	0	1	D	2	-						
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-						
38	ER	F1 G1	-	F3 G1	-	-	-	D1 G2	-	1	0	3	D	4	12						
	GL	D1 G1	-	F3 G1	-	-	-	D1 G2	-	1	0	3	D	4	-						
	SR	D1 G1	-	F3 G1	-	-	-	D1 G1	-	1	0	3	D	4	-						
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-						
39	ER	D1 G1	-	F2 G1	-	F1 G1	-	D1 G1	-	1	2	2	E	5	14						
	GL	D2 G3	-	F2 G1	-	F1 G1	-	D1 G1	-	2	2	2	E	6	-						
	SR	D1 G1	-	F2 G1	-	-	-	D1 G1	-	1	0	2	D	3	-						
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-						
40	ER	D2 G3	-	D2 D2	-	D1 G1	-	D2 G3	-	2	1	2	E	5	13						
	GL	D2 G2	-	D2 D2	-	D1 G1	-	D2 G3	-	2	2	2	E	6	-						
	SR	D2 G2	-	D2 D2	-	-	-	-	-	2	0	0	B	2	-						
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-						
41	ER	F1 G1	-	D3 G2	-	F2 G1	-	D1 G1	-	1	3	3	E	7	21						
	GL	D2 G1	-	D3 G2	D3	F2 G3	-	D2 G3	-	2	3	3	E	8	-						
	SR	D2 G1	-	D2 G2	D3	F2 G2	-	D1 G1	-	2	2	2	E	6	-						
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-						
42	ER	F1 G1	-	F1 G1	-	-	-	F2 G1	-	1	0	2	D	3	13						
	GL	D2 G2	-	F1 G1	-	F1 G2	-	D3 G3	D3	1	1	3	E	5	-						
	SR	D1 G1	-	F1 G1	-	F1 G1	-	F3 G1	-	1	1	3	E	5	-						
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-						

Nº VB.		PAS				AZUL 2.5				AZUL 0.5				ALD-FUC				MN	MAMS	MAPS	TIPO	SUMA	TOTAL	MP
		AR CELU		AR CELU		AR CELU		AR CELU		AR CELU		AR CELU												
		--	PM TO	--	PM TO	--	PM TO	--	PM TO	--	PM TO	--	PM TO											
43	ER	D1 G1	-	D2 G1	-	-	-	-	G1 G1	-	1	0	2							D	3	9		
	GL	D1 G1	-	D2 G1	-	-	-	-	G1 G1	-	1	0	2							D	3	-		
	SR	D1 G1	-	D2 G1	-	-	-	-	G1 G1	-	1	0	2							D	3	-		
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0							A	0	-		
44	ER	D2 G2	-	D2 G1	-	F1 G1	-	-	G2 G2	-	2	2	1							E	5	13		
	GL	D2 G2	-	D2 G1	-	-	-	-	G2 G2	-	2	0	2							D	4	-		
	SR	D2 G2	-	D2 G1	-	-	-	-	G2 G2	-	2	0	2							D	4	-		
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0							A	0	-		
45	ER	D1 G1	-	D1 G1	-	F1 G1	-	-	G1 G1	-	1	1	1							E	3	9		
	GL	D1 G1	-	D1 G1	-	F1 G1	-	-	G1 G1	-	1	1	1							E	3	-		
	SR	D1 G1	-	D1 G1	-	F1 G1	-	-	G1 G1	-	1	1	1							E	3	-		
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0							A	0	-		
46	ER	D1 G1	-	D2 G1	-	F1 G1	-	-	D2 G2	-	1	2	2							E	5	11		
	GL	D1 G1	G3	D2 G1	D1	-	-	-	D2 G1	-	1	0	2							D	3	-		
	SR	D1 G1	-	D2 G1	-	-	-	-	D2 G1	-	1	0	2							D	3	-		
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0							A	0	-		
47	ER	D1 G1	-	-	-	F3 G1	-	-	D1 G1	-	1	0	1							D	2	11		
	GL	D1 G2	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0							B	2	-		
	SR	D1 G1	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0							A	0	-		
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0							A	0	-		
48	ER	D2 G3	-	-	-	-	-	-	D2 G3	-	2	1	2							E	5	20		
	GL	D3	G3	-	-	F3 G3	-	-	D3 G3	-	3	3	3							E	9	-		
	SR	D2 G2	-	-	-	F1 G3	-	-	D3 G3	-	2	1	3							E	6	-		
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0							A	0	-		
49	ER	D1 G1	-	D1 G3	-	-	-	-	D1 G1	-	1	0	1							D	2	5		
	GL	-	-	D1 G3	-	-	-	-	D1 G1	-	0	0	3							H	3	-		
	SR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0							A	0	-		
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0							A	0	-		
50	ER	D1 G1	-	D2 G1	-	F1 G1	-	-	D2 G1	-	1	2	2							E	5	18		
	GL	D2 G2	-	F3	G3	F2 G3	-	-	D2 G1	-	2	3	2							E	7	-		
	SR	D2 G2	-	D1 G2	-	F2 G3	-	-	D2 G1	-	2	2	2							E	6	-		
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0							A	0	-		
51	ER	D1 G1	D3	F1 G1	D3	-	-	-	D1 G1	-	1	0	0							D	2	8		
	GL	D2 G3	-	F3 G3	D3	-	-	-	D3 G3	D3	2	0	1							D	5	-		
	SR	D1 G1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	3							B	1	-		
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0							A	0	-		
52	ER	D1 G1	-	D1 G1	-	F1 G1	-	-	D1 G1	-	1	1	0							E	3	14		
	GL	D1 G1	-	D1 G2	D3	F1 G1	-	-	D1 G1	-	1	1	1							E	3	-		
	SR	D1 G1	-	D1 G1	-	F2 G2	-	-	D1 G1	-	1	2	1							E	4	-		
	SL	D1 G1	-	D1 G1	-	F2 G2	-	-	D1 G1	-	1	2	1							E	4	-		
53	ER	D1 G1	-	D2 G1	-	-	-	-	D1 G1	-	1	0	2							D	3	11		
	GL	D1 G1	-	D2 G1	-	-	-	-	D1 G1	-	1	0	2							D	3	-		
	SR	D1 G1	-	D2 G1	-	-	-	-	D1 G1	-	1	0	2							D	3	-		
	SL	D1 G1	-	D2 G1	-	-	-	-	D1 G1	-	1	0	2							D	3	-		
54	ER	D1 G1	-	-	-	-	-	-	F1 G1	-	1	0	1							D	2	-		
	GL	D1 G1	-	-	-	-	-	-	F1 G1	-	1	0	1							D	2	6		
	SR	D1 G1	-	-	-	-	-	-	F1 G1	-	1	0	1							D	2	-		
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0							A	0	-		
55	ER	D1 G1	-	D2 G1	-	F1 G1	-	-	D1 G1	-	1	1	1							E	3	15		
	GL	D1 G1	-	D2 G1	-	F1 G3	-	-	D2 G3	-	1	3	3							E	7	-		
	SR	D1 G1	-	D2 G1	-	F1 G1	-	-	D1 G1	-	1	1	1							E	3	-		
	SL	D1 G1	-	D2 G1	-	-	-	-	D1 G1	-	1	0	1							D	2	-		
56	ER																							
	GL																							
	SR																							
	SL																							

NO VALIDA

NO VALIDA

Nº VB.	PAS				AZUL 2.5				AZUL 0.5				ALD-FUC				MN	MAMS	MAPS	TIPO	SUMA	TOTAL	MP
	AR CELU				AR CELU				AR CELU				AR CELU										
	--	PM	TO		--	PM	TO		--	PM	TO		--	PM	TO								
57	ER	D1	G1	-												1							
	GL	-	-	-												0							
	SR	-	-	-												0							
	SL	-	-	-												0							
58	ER	D2	G2	-	D1	D1	-	F1	G1	-	D1	G1	-	D1	G1	-	2	1	1	E	4	12	
	GL	D2	-	D3	D1	D1	-	F1	G2	-	D1	G2	-	D1	G2	-	2	1	1	E	4	-	
	SR	D2	G2	-	D1	D1	-	-	-	-	D1	G1	-	D1	G1	-	2	1	1	E	4	-	
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-		
59	ER	D2	G2	-				F1	G1	-	D1	G2	-	D1	G2	-	2	1	1	E	4	17	
	GL	D3	G3	-				F2	G3	-	D2	G3	-	D2	G3	-	3	2	2	E	7	-	
	SR	D2	G2	-				F2	G3	-	D1	G2	-	D1	G2	-	1	1	1	E	4	-	
	SL	-	-	-				F1	G1	-	D1	G2	-	D1	G2	-	0	1	1	F	2	-	
60	ER	D1	G1	-	D2	G2	-	-	-	-	D1	G2	-	D1	G2	-	1	0	2	D	3	15	
	GL	D1	G1	-	D2	G2	-	-	-	-	D1	G2	-	D1	G2	-	1	0	2	D	3	-	
	SR	D2	G2	-	D2	G2	-	F1	G2	-	D1	G2	-	D1	G2	-	2	2	2	E	6	-	
	SL	-	-	-	D2	G2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	2	D	3	-		
61	ER	D1	G2	-				F1	G1	-	D1	G1	-	D1	G1	-	1	1	1	E	3	10	
	GL	D2	G2	-				-	-	-	D2	G3	-	D2	G3	-	2	0	2	D	4	-	
	SR	D1	G1	-				-	-	-	D2	G3	-	D2	G3	-	1	0	2	D	3	-	
	SL	-	-	-				-	-	-	D1	G1	-	D1	G1	-	0	0	0	A	0	-	
62	ER	D1	G2	-	D1	G2	-	F1	G1	-	D1	G1	-	D1	G1	-	2	2	2	E	6	12	
	GL	D2	G2	-	D1	G1	-	-	-	-	D1	G1	-	D1	G1	-	2	0	1	D	3	-	
	SR	D2	G2	-	D1	G1	-	-	-	-	D1	G1	-	D1	G1	-	2	0	1	D	3	-	
	SL	-	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-		
63	ER				D3	G3	-	D1	G2	-	D3	G2	-	D3	G2	-	1	3	3	E	7	21	
	GL				D3	G3	D3	D1	G2	-	D3	G2	-	D3	G2	-	1	3	3	E	7	-	
	SR				D3	G3	-	F1	1G	-	D3	G2	-	D3	G2	-	1	3	3	E	7	-	
	SL				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-		
64	ER	D2	G1	-	D2	G2	-	F3	G2	-	D2	G2	-	D2	G2	-	2	3	2	E	7	18	
	GL	D2	G1	-	D2	G2	-	F3	G1	-	D2	G2	-	D2	G2	-	2	3	2	E	7	-	
	SR	D2	G1	-	D2	G2	-	-	-	-	D2	G2	-	D2	G2	-	2	0	2	D	4	-	
	SL	-	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-		
65	ER	F1	G2	-	D3	G2	-	F1	G1	-	D1	G1	-	D1	G1	-	1	3	3	E	7	21	
	GL	D2	-	D3	F3	G3	D3	F2	G3	-	D2	G3	-	D2	G3	-	2	3	3	E	8	-	
	SR	D2	-	D3	D2	G1	-	F1	G1	-	D2	G3	-	D2	G3	-	2	2	2	E	6	-	
	SL	-	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-		
66	ER	D1	G1	D3	D2	G1	-	F1	G1	-	D1	G2	-	D1	G2	-	1	2	2	E	5	17	
	GL	D2	G2	-	D2	G3	D3	F1	G1	-	D2	G3	D3	D2	G3	D3	2	3	3	E	8	-	
	SR	D1	G1	-	D2	G1	-	-	-	-	D2	G3	-	D2	G3	-	1	0	3	D	4	-	
	SL	-	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-		
67	ER	D1	G1	-	D1	G1	-	-	-	-	D1	G2	-	D1	G2	-	1	0	1	A	2	17	
	GL	D3	G3	-	D1	G2	-	F2	G2	-	D2	G3	D3	D2	G3	D3	3	2	2	E	7	-	
	SR	D2	G2	-	D1	G2	-	F2	G2	-	D2	G2	-	D2	G2	-	2	2	2	E	6	-	
	SL	-	-	-	D1	G2	-	-	-	-	D2	G2	-	D2	G2	-	0	0	2	H	2	-	
68	ER	D2	G2	-	D2	G2	-	F1	G1	-	D2	G2	-	D2	G2	-	2	2	2	E	6	16	
	GL	D2	G2	-	D2	G3	-	F1	G2	-	D2	G2	-	D2	G2	-	2	2	2	E	6	-	
	SR	D2	G2	-	D2	G2	-	-	-	-	D2	G2	-	D2	G2	-	2	0	2	A	4	-	
	SL	-	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-		
69	ER							-	-	-	F1	G1	-	-	-	-	0	0	1	A	1	1	
	GL							-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-		
	SR							-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-		
	SL							-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-		
70	ER	F3	G2	-	F3	G2	-	F1	G2	-	D2	G3	-	D2	G3	-	3	3	3	E	9	22	
	GL	D2	G2	D3	F3	G3	D3	F3	G3	D3	F3	G3	-	D2	G3	-	2	3	3	E	8	-	
	SR	F1	G1	D3	D1	G1	-	F2	G3	-	D2	G3	-	D2	G3	-	1	2	2	E	5	-	
	SL	-	-	-	-	-	-	F2	G3	-	D1	G1	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-	

Nº	VB.	PAS		AZUL 2.5		AZUL 0.5		ALD-FUC		MN	MAMS	MAPS	TIPO	SUMA	TOTAL	MP
		AR	CELU	AR	CELU	AR	CELU	AR	CELU							
		--	PM TO	--	PM TO	--	PM TO	--	PM TO							
71	ER	D2	G2	-	-	-	-	D1	G2	-	2	0	1	D	3	9
	GL	D2	G3	-	-	-	-	D1	G2	-	2	0	1	D	3	-
	SR	D2	G2	-	-	F1	G2	D1	G2	-	2	0	1	D	3	-
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	D	0	-
72	ER	F1	G1	-	D1	G1	-	F1	G1	D3	1	0	1	A	2	6
	GL	F1	G1	-	D1	G1	-	F1	G1	-	1	0	1	D	2	-
	SR	F1	G1	-	D1	G1	-	F1	G1	-	1	0	1	D	2	-
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	D	0	-
73	ER	F3	G2	-	-	-	-	D2	G2	-	3	0	2	A	5	7
	GL	F2	G1	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0	B	2	-
	SR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-
74	ER	D2	G1	-	-	-	-	F1	G1	-	2	0	1	D	3	9
	GL	D2	G1	-	-	-	-	F1	G1	-	2	0	1	D	3	-
	SR	D2	G1	-	-	-	-	F1	G1	-	2	0	1	D	3	-
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-
75	ER	D1	G1	D3	F1	G1	-	F1	G1	-	1	0	1	D	2	7
	GL	D2	G1	-	F1	G2	-	F1	G1	-	2	0	1	D	3	-
	SR	F1	G1	-	F1	G1	-	F1	G1	-	1	0	1	D	2	-
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	D	0	-
76	ER	D3	G3	-	D3	G2	-	F1	G1	-	3	3	3	A	9	24
	GL	D3	-	D3	F2	G3	D3	F2	G2	-	D2	G3	D3	E	7	-
	SR	D2	G3	-	D3	G2	-	F1	G1	-	2	3	3	E	8	-
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	E	0	-
77	ER	D1	G1	-	D2	G2	-	F1	G1	-	1	2	2	A	5	19
	GL	D3	-	D3	F1	G3	D3	F2	G1	-	D1	G3	-	E	6	-
	SR	D2	G3	-	D1	G1	-	F2	G1	-	D1	G3	-	E	5	-
	SL	F1	G2	-	D2	G2	-	-	-	-	D1	G3	-	D	3	-
78	ER	F1	G1	-	F1	G1	-	-	-	-	1	0	1	D	2	4
	GL	F1	G2	-	F1	G1	-	-	-	-	1	0	1	D	2	-
	SR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-
79	ER	F1	G1	-	F1	G1	-	-	-	-	1	0	1	A	2	6
	GL	F1	-	D3	F1	G1	-	-	-	-	1	0	1	D	2	-
	SR	F1	G1	-	F1	G1	-	-	-	-	1	0	1	D	2	-
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	D	0	-
80	ER	D1	G2	-	F2	G1	-	-	-	-	1	0	2	A	3	8
	GL	D1	G2	D3	F1	G1	D2	-	-	-	1	0	1	D	2	-
	SR	D1	G2	-	F2	G1	-	-	-	-	1	0	2	D	3	-
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-
81	ER	F1	G1	D3	-	-	-	-	-	-	1	0	1	A	2	7
	GL	D2	D2	-	-	-	F1	G1	-	D1	G2	-	2	1	1	4
	SR	-	-	-	-	-	-	-	-	D1	G2	-	0	0	1	-
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	H	0	-
82	ER	D1	G1	-	D3	G2	-	F2	G1	-	1	3	3	A	7	9
	GL	D1	G1	-	D1	G1	-	-	-	-	1	0	1	E	2	-
	SR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-
83	ER	F1	G1	-	D1	G1	-	-	-	-	1	0	1	D	2	4
	GL	F1	G1	-	F1	G1	-	-	-	-	1	0	1	D	2	-
	SR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-
84	ER	F1	D1	-	F1	G1	-	-	-	-	1	0	1	D	2	9
	GL	F1	G3	-	D2	G3	D3	F1	G2	-	F1	G3	D3	E	5	-
	SR	-	-	-	D2	G2	-	-	-	-	0	0	2	H	2	-
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	A	0	-

Nº VB.	PAS				AZUL 2.5				AZUL 0.5				ALD-FUC				MN	MAMS	MAPS	TIPO	SUMA	TOTAL	MP
	AR CELU				AR CELU				AR CELU				AR CELU										
	--	PM	TO		--	PM	TO		--	PM	TO		--	PM	TO								
85	ER	D1	G1	-	D2	G1	-	D1	G1	-	D1	G1	-	1	2	2			E	5	18		
	GL	D2	G2	D3	D2	G2	-	F2	G1	-	D1	G1	-	2	2	2			E	6	-		
	SR	D1	G1	D3	F3	G1	-	F2	G1	-	D1	G1	-	1	3	3			E	7	-		
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0			E	0	-		
86	ER	D3	G3	-	D2	G3	-	-	-	-	D1	G1	-	3	0	2			D	5	12		
	GL	D1	G1	-	D2	G3	D3	F1	G3	-	D1	G2	D3	1	2	2			E	5	-		
	SR	-	-	-	D2	G3	-	-	-	-	D1	G1	-	0	0	2			H	2	-		
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0			A	0	-		
87	ER	D1	G1	-	D1	G1	-	-	-	-	D1	G1	-	1	0	1			D	2	6		
	GL	D1	G1	-	D1	G1	-	-	-	-	D1	G1	-	1	0	1			D	2	-		
	SR	D1	G1	-	D1	G1	-	-	-	-	D1	G1	-	1	0	1			D	2	-		
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0			A	0	-		
88	ER	D3	G2	-	D1	G2	-	F1	G1	-	F1	G1	-	3	1	1			E	5	12		
	GL	D3	-	G3	D1	G2	D3	-	-	-	F2	G3	-	3	0	2			D	5	-		
	SR	D1	G1	-	D1	G2	-	-	-	-	F1	G2	-	1	0	1			D	2	-		
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0			A	0	-		
89	ER	F1	G1	-	F1	G1	-	-	-	-	F1	G1	D3	1	0	1			D	2	19		
	GL	D3	-	D3	F3	G3	D3	F2	G2	-	F3	G3	D3	3	3	3			E	9	-		
	SR	D2	G2	D3	F2	G1	D2	F1	G1	-	D3	G3	D3	2	2	3			E	7	-		
	SL	D1	G2	D3	D1	G1	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0			B	1	-		
90	ER	D1	G2	-	D2	G2	-	F2	G1	-	D1	G2	-	1	2	2			E	5	18		
	GL	D2	G2	D3	F2	G2	D2	F2	G3	-	D2	G3	D3	2	2	2			E	6	-		
	SR	D1	G1	-	D2	G1	-	F2	G1	-	D2	G3	D3	1	2	2			E	5	-		
	SL	D1	G1	-	D1	G1	-	-	-	-	D1	G1	-	1	0	1			D	2	-		
91	ER	F1	G1	D3	F2	G1	D3	-	-	-	D1	G2	-	1	0	2			D	3	11		
	GL	F1	G1	-	F2	G1	-	-	-	-	D1	G2	-	1	0	2			D	3	-		
	SR	F1	G1	-	F2	G1	-	F1	G2	-	D1	G1	-	1	2	2			E	5	-		
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0			A	0	-		
92	ER	D1	G1	-	F1	G1	-	-	-	-	F1	G1	-	1	0	1			D	2	4		
	GL	D1	G1	-	F1	G1	-	-	-	-	F1	G1	-	1	0	1			D	2	-		
	SR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0			A	0	-		
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0			A	0	-		
93	ER	D2	G3	-	-	-	-	F1	G1	-	F1	G1	-	2	1	1			E	4	11		
	GL	D2	G3	-	-	-	-	F1	G1	-	F1	G1	-	2	1	1			E	4	-		
	SR	D2	G3	-	-	-	-	-	-	-	F1	G1	-	2	0	1			D	3	-		
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0			A	0	-		
94	ER	D1	G2	-	D1	G1	-	F1	G1	-	D1	G2	-	1	1	1			E	3	7		
	GL	D1	G2	-	D1	G1	-	F1	G1	-	D1	G2	-	1	1	1			E	3	-		
	SR	-	-	-	D1	G1	-	-	-	-	D1	G2	-	0	0	1			H	1	-		
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0			A	0	-		
95	ER	D1	G1	-	D1	G1	-	-	-	-	-	-	-	1	0	1			D	2	6		
	GL	D1	G1	-	D1	G1	-	-	-	-	-	-	-	1	0	1			D	2	-		
	SR	D1	G1	-	D1	G1	-	-	-	-	-	-	-	1	0	1			D	2	-		
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0			A	0	-		
96	ER	D1	G2	-	D1	G1	-	-	-	-	D2	G1	-	1	0	2			A	3	11		
	GL	D1	G2	-	D1	G1	-	F1	G1	-	D2	G2	-	1	1	2			E	4	-		
	SR	D1	G2	-	D1	G1	-	-	-	-	D2	G1	-	1	0	2			D	3	-		
	SL	D1	G2	-	-	-	-	-	-	-	D1	G1	-	1	0	0			B	1	-		
97	ER	D2	G3	D3	D1	G2	-	F1	G1	-	D2	G3	-	2	1	2			E	5	19		
	GL	D3	-	D3	F3	G3	D3	F2	G3	-	D3	G3	D3	3	3	3			E	9	-		
	SR	D2	G3	-	D1	G1	-	F1	G1	-	D2	G3	D3	2	1	2			E	5	-		
	SL	-	-	-	-	-	-	F3	G3	-	D2	G3	D3	0	0	0			A	0	-		
98	ER	D1	G1	-	D1	G1	-	-	-	-	D2	G1	-	1	0	2			D	3	19		
	GL	D3	-	G3	D3	G2	D3	F1	G3	-	D2	G3	-	3	3	3			E	9	-		
	SR	D3	-	G3	D1	G2	D3	F3	G3	-	D2	G3	-	2	1	2			E	5	-		
	SL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	2			E	5	-		

Nº VB.	PAS	AZUL 2.5	AZUL 0.5	ALD-FUC	MN	MAMS	MAPS	TIPO	SUMA	TOTAL	MP
	AR CELU	AR CELU	AR CELU	AR CELU							
	-- PM TO	-- PM TO	-- PM TO	-- PM TO							
99	ER										
	GL	NO VALIDA									
	SR										
	SL										
100	ER	F1 G1 -	F3 G1 -	F1 G1 -	F1 G1 -	1	3	3	E	7	16
	GL	D1 G2 -	F1 - D2	F1 G1 -	F2 G1 -	1	1	2	E	4	-
	SR	D1 G2 -	D1 G2 -	F1 G1 -	F3 G1 -	1	1	3	E	5	-
	SL	- - -	- - -	- - -	- - -	0	0	0	A	0	-

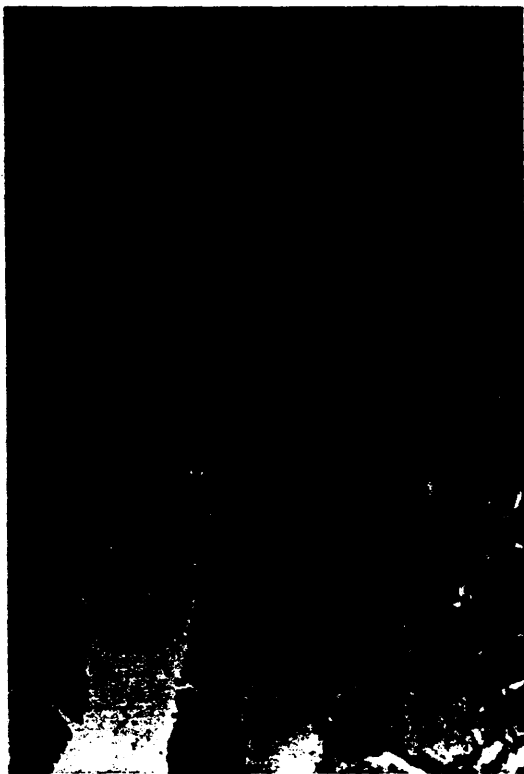


FIGURA Nº 23.- Escasa PAS positividad en el epitelio superficial en una VB con colesterosis.  
( PAS 100 x)





FIGURA Nº 24.- Glándulas tipo antro gástrico con contenido abundante de mucinas neutras.  
(PAS 100 x)



FIGURA Nº 25.- Glándulas tipo antro gástrico con contenido  
PAS positivo importante.  
( PAS 200 x)

El patrón tintorial en las GL ha sido de tipo difuso en 81 (85.2%) con 31 (32.6%) grado 1 de intensidad, 35 (36.8%) grado 2, 15 (15.7%) grado 3 y en sólo 12 VB (12.6%) se han teñido de modo focal. De ellas en 10 (10.5%) con un grado 1 y 2 (2.1%) grado 2. En 2 VB no hubo ninguna tinción.

En ocasiones y dado que se produce la tinción con el PAS más frecuentemente en las glándulas, se observa una menor intensidad en el epitelio y mayor en las glándulas. (FIGURA Nº 26)

- SRA: en 82 de los casos (86.3%) fueron observados con tinción PAS positiva, indicando existencia de MN como ya se ha indicado en la exposición del material y métodos. (FIGURA Nº 27) En 13 VB (13.6%) no hubo o tinción positiva o no se encontraron SRA.

En los casos positivos la distribución de las mucinas fue difusa en 68 (71.5%) con 37 (38.9%) del grado 1; 30 (31.5%) del grado 2 y 1 (1%) del grado 3. De modo focal se localizó en 14 (14.7%) con 12 (12.6%) con intensidad 1, 1 (1%) del grado 2 y 1 (1%) del grado 3.

- SL: aparecieron teñidos en 14 VB (14.7%) estando de manera difusa en 12 (12.6%) con 9 (9.4%) del grado 1; 2 (2.1%) del grado 2 y 1 (1%) del 3. Solo en 2 ocasiones la VB se tiñó en los SL de modo focal con intensidad del grado 1. (2.1%)

## 2.a. 2. - VISION CELULAR: (CELU)

### - POLO MUNDIAL (PM).

Dentro de la visión centrada de la célula y en concreto del polo apical o mundial que es donde se centran de manera principal los acumulos de MP, se han observado:



FIGURA Nº 26.- Folículo linfoide en una VB con colecistitis crónica. Hay escaso depósito de mucinas neutras en el ER superficial, aunque se mantiene en las glándulas. (PAS 50 x)

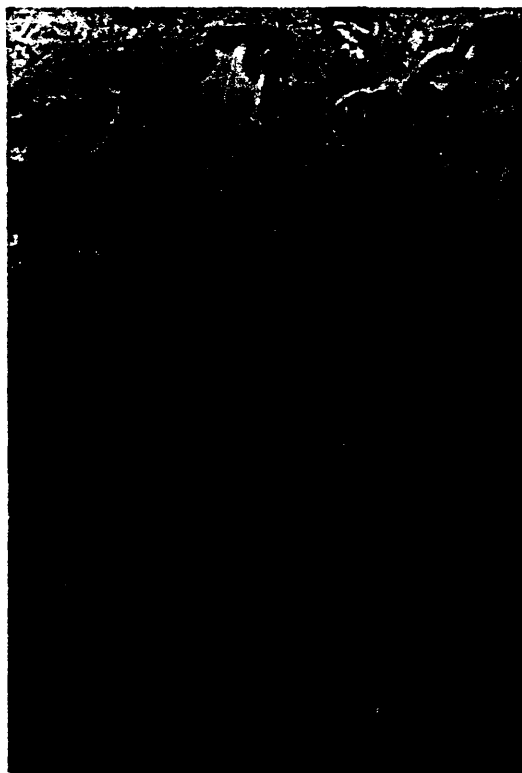


FIGURA Nº 27.-    Seños de Rockitansky- Aschoff y glándulas  
con contenido moderado de mucinas neutras.  
(PAS 50 x)

- ER: en 59 VB (62.1%) se obtuvo tinción con el PAS de modo granular grado 1; en 25 (26.3%) grado 2 y en 10 (10.5%) grado 3.

Este aspecto granular en la zona apical puede ser en forma de pequeños gránulos (FIGURA Nº 28) o bien como una gran colección de MP en este caso neutras que ocupan prácticamente todo el citoplasma de la zona mundial de la célula. (FIGURA Nº 29)

En comparación con los 94 casos de distribución granular, sólo 1 caso de los de la muestra tenía afectación difusa y en grado 1.

- GL: en 15 VB (15.7%) no se encontró ninguna positividad al PAS en el PM de las células glandulares. De las 80 positivas, 79 (83.1%) fueron con conformación granular y siendo del grado 1 en 37 (38.9%); grado 2 en 30 (31.5%) y del 3 en 12 (12.6%).

El único caso de forma difusa de las MN tenía una intensidad grado 2.

- SRA: se tiñeron en la zona apical en 71 casos (74.7%) siempre de forma granular. En 47 (49.7%) fue de grado 1; en 27 (28.4%) grado 2 y en 7 (7.3%) grado 3.

- SL: sólo se consiguieron visualizar en 14 VB (14.7%) siendo en todas ellas con patrón granular. En 8 (8.4%) lo fueron de intensidad 1; en 5 (5.2%) del 2 y en 1 (1%) del grado 3.

- TOTALIDAD CELULAR (TO).

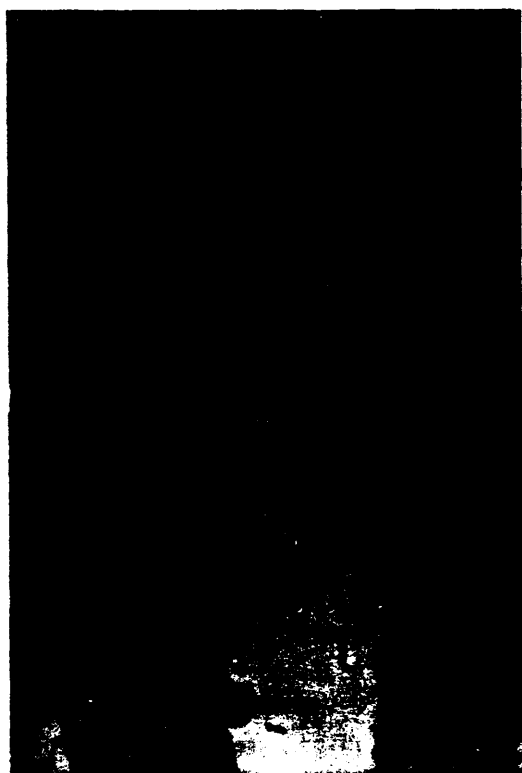


FIGURA Nº 28.- Células del epitelio de revestimiento con gránulos de contenido moderado en mucinas neutras en el polo mundial celular.  
(PAS 500 x)



FIGURA Nº 29.- Células caliciformes con el citoplasma repleto de mucinas neutras. En el polo apical de las células que revisten las glándulas se observan pequeños gránulos.  
(PAS 200 x)



En la visión celular para detectar tinciones de la totalidad de la misma con el PAS se han obtenido sólo 26 casos positivos (27.3%).

- RE: 7(7.3%) afectò al ER con una distribución difusa y muy intensa con grado 3 en todas. (FIGURA N° 29)
- GL: se tiñeron en toda la célula en 21 casos (22.1%) siendo en 7 granular y con intensidad de 3. En los otros 14 (14.7%) fue difuso y también con grado 3.
- SRA: en 7 casos (7.3%) hubo células afectadas totalmente. El patrón fue granular en 3 de los que 1 fue grado 1, 1 grado 2 y 1 grado 3. El patrón difuso se vió en 4 (4.2%) siendo en todos grado 3.
- SL: sólo perteneció a este aspecto tintorial 1 VB y con grado 3.

## 2.b. ESTUDIO CON AA pH= 2.5.-

Con este método se tiñen las mucinas ácidas, por lo que se puede determinar su presencia y también su cantidad, en base a la intensidad de tinción encontrada.

El 16 VB la técnica no fue correcta totalmente por lo que se excluyeron quedando reducido el número a valorar a 84.

### 2.b.1.- VISION ARQUITECTURAL (AR):

- ER: la tinción fue difusa en 55 (65.4%) con 32 (38.1%) de grado 1; 18 (21.4%) grado 2 o moderado y 5 (5.9%) del 3. La distribución difusa de las mucinas ácidas con tinción positiva al AA pH= 2.5 se muestra con un ribete de coloración azul más o menos intensa según la cantidad de mucina. (FIGURA Nº 30) En los casos de colesterosis se produjo una tinción en general bastante intensa como muestra la FIGURA Nº 31.

El patrón focal se produjo en 29 casos (34.5%) con 19 (22%) del grado 1; 5 (5.9%) del grado 2 o moderado (FIGURA Nº 32) y 5 (5.9%) grado 3.

- GL: se encontró la tinción de manera difusa en las células de las glándulas en 50 casos (59.5%) (FIGURA Nº 33) incluyendo las zonas que existen de metaplasia que poseen una tinción intensa. (FIGURA Nº 34) La intensidad fue del grado 1 en 25 (29.7%); grado 2 en 21 (25. %) y tipo 3 en 4 (4.7%)

La distribución de la mucina de manera focal se ha encontrado en 34 (40.4%) con 18 (21.4%) que pertenecían a una intensidad 1 o leve y que se observa al microscopio como una coloración azul muy tenue. (FIGURA Nº 35) En 9 casos (10.7%) fue moderado o grado 2 y en 7 (8.3%) fue intenso o grado 3. (FIGURA Nº 36)

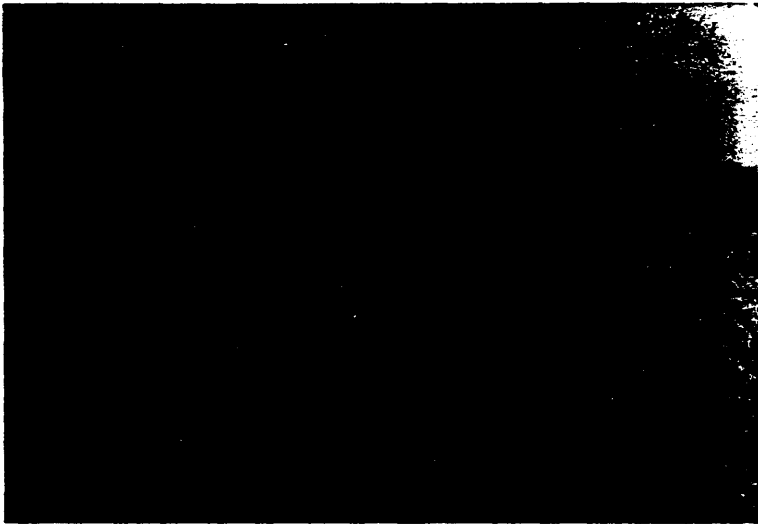


FIGURA Nº 30..- Mucinas ácidas en el epitelio de revestimiento y en algunas de las células de una glándula tipo antro gástrico.  
(AA pH=2.5. 200 x)

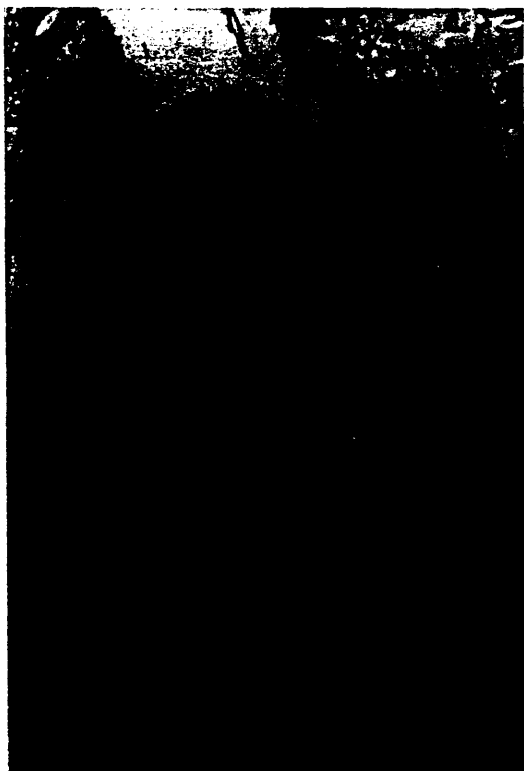


FIGURA Nº 31.- Intensa positividad de las mucinas ácidas  
en la colesterolesis, mostrado en el ER.  
AA pH=2.5. 100 x)



FIGURA Nº 32.- Moderada cantidad de mucinas ácidas en  
el ER en una VB con colesterolesis.  
(AA pH= 2.5. 100 x)

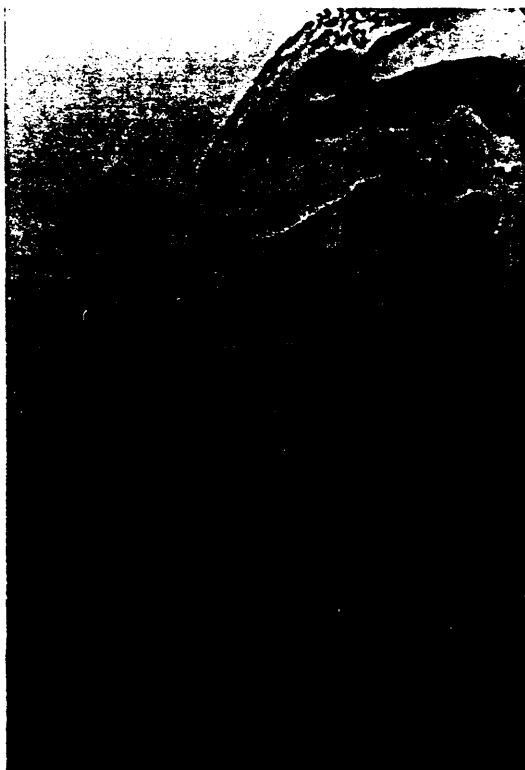


FIGURA Nº 33. - Abundantes mucinas ácidas en las glándulas  
normales y en la metaplasia antral.  
(AA pH=2.5. 50 x)



FIGURA Nº 34.- Extensa metaplasia antral. Se observa gran cantidad de mucinas ácidas, especialmente a nivel de las glándulas.  
(AA pH= 2.5. 50 x)

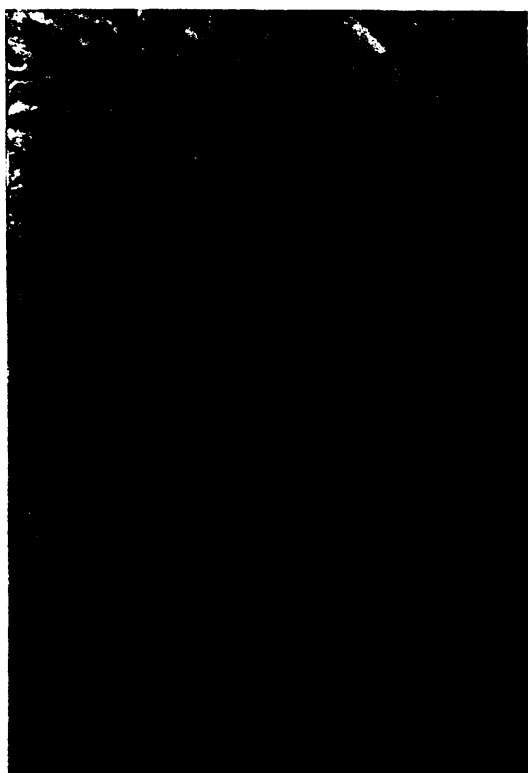


FIGURA Nº 35.- Células con mucinas ácidas en la metaplasia antral de grado leve y de aparición focal.  
(AA pH= 2.5. 200 x)



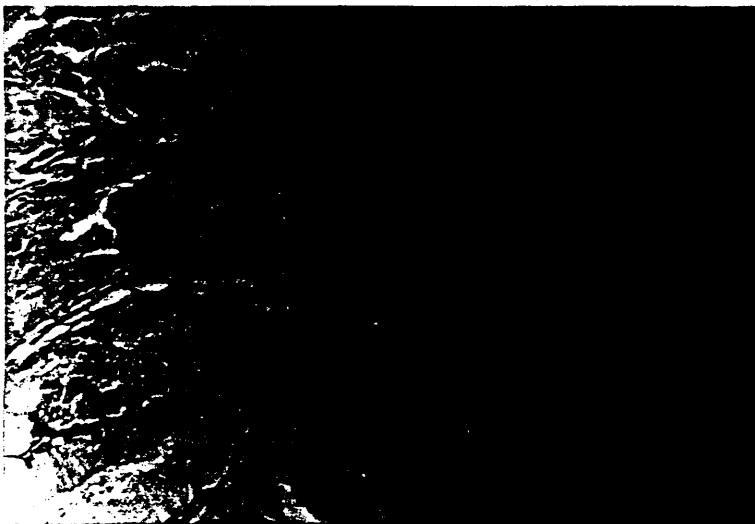


FIGURA Nº 36.- Células que de manera focal muestran mu-  
cinas ácidas intracitoplasmáticas, en las glán-  
dulas tipo antro gástrico.  
(AA pH= 2.5. 200 x)

- SRA: no se obtuvo ninguna tinción en 9 VB o no se encontraron SRA en ellas. En 57 (67.8%) que sí se tiñeron por poseer MP ácidas lo hicieron de modo difuso. En 35 (41.6%) con intensidad 1; en 20 (23.8%) grado 2 y en 2 (2.3%) grado 3.

En 18 VB (21.4%) fue con distribución granular correspondiendo 10(11.9%) a grado 1; 6 (7.1%) al grado 2 y 2 (2.3%) al 3.

- SL: aparecieron teñidos con el AA pH=2.5 en 13 casos (15.4%) siempre de manera difusa. En 9 (10.7%) grado 1 y en 4 (4.7%) grado 2. En las 71 muestras restantes no aparecieron o no fueron positivas a la reacción tintorial.

## 2.b.2.- VISION CELULAR (CELU):

### - POLO MUNDIAL (PM).

- ER: en 81 de los 84 fueron teñidos de modo granular, lo que supone el 96.4%. La intensidad fue de grado 1 en (65.4%); grado 2 en 22 (26.1%) y grado 3 en 4 (4.7%). En estos casos de gran cantidad de MP en el PM se produce un rechazamiento del núcleo debido al problema de espacio que plantean los gránulos. (FIGURA Nº 37) Solo 3 casos difusos, 1 grado 1 y 2 grado 2.

- GL: la distribución de las MP en las GL fue granular en 75 casos (89.2%) con 38 (45.2%) grado 1; 21 (25%) grado 2 y en 6 (7.1%) grado 3.

En 3 (3.5%) fue difusa la distribución con 1 grado 1 de intensidad y 2 del grado 2. En 6 (7.1%) no hubo presencia de gránulos o MP AA pH=2.5 positivos.

- SRA: en 10 casos (11.9%) no hubo tinción. En 73 (86.9%) fue de distribu-

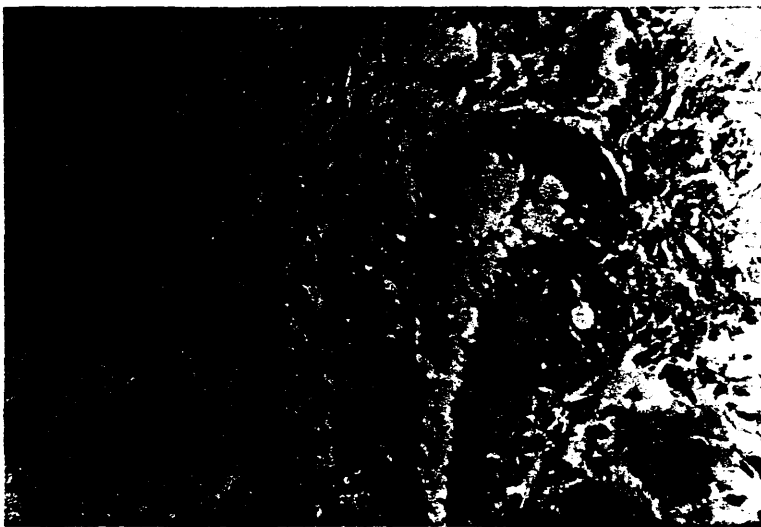


FIGURA Nº 37.- Positividad para mucinas ácidas en la metaplasia antral. Se observan restos de cálculo incluido en la pared.  
(AA pH=2.5. 200 x)

ción granular, con 48 (57.1%) del grado 1; 22 (26.1%) grado 2 y 3 (3.5%) grado 3. Sólo 1 caso tuvo una distribución difusa y con grado 1 (1.1%).

- SL: sólo aparecieron teñidos con contenido de MP ácida en 13 casos de forma granular en todos (15.4%). Con un grado 1 en 8 (9.5%) y en 5 (5.9%) grado 2. El resto de las 71 VB fue negativo.

- TOTALIDAD CELULAR (TO).

En toda la distribución celular se ha visto tinción con el AA pH= 2.5 en 35 VB (41.6%) estando repartidas según las distintas partes en:

- ER: se encontró teñida toda la célula en 5 VB (5.9%) de modo difuso siendo 1 (1.1%) del grado 2 y 4 (4.7%) grado 3.
- GL: en 35 casos (41.6%) fue teñido, siendo con afectación difusa en 31 (36.9%) . Con un grado 1 se presentó 1 VB (1.1%); con grado 2, 4 VB (4.7%) y con grado 3 en 26 casos (30.9%).

Sólo en 4 casos (4.7%) la distribución fue granular con intensidad 3.

- SRA: se afectaron de manera difusa en 5 casos ( 5.9%) con grado 2 en 1 y con grado 3 en las otras 4 (4.7%). En 2 VB fue de modo granular con intensidad grado 3. En el resto no se encontró tinción en toda la célula .
- SL: no hubo ningún caso de tinción con el AA pH=2.5 de toda la célula en los SL.

## 2.c. ESTUDIO CON AA pH= 0.5.-

Con esta técnica se produce la tinción de las mucinas ácidas y en particular las MAMS. La muestra total fue de 95 VB dado que en 5 no se tuvieron en cuenta los resultados por técnica incorrecta.

En 27 casos (28.4%) no hubo positividad con este método por lo que se deduce que no contenían MAMS. (FIGURA Nº 38)

### 2.c.1. VISION ARQUITECTURAL (AR):

- ER: se tiñe focalmente en 43 casos (45.2%) siendo grado 1 en 33 (34.7%); 8 VB (8.4%) del grado 2 y en 2 casos (2.1%) grado 3. En ocasiones se produce una tinción más intensa en unas zonas y menos en otras. (FIGURA Nº 39)

En 3 VB (3.1%) fue de distribución difusa y grado 1. En los 22 casos restantes (23.1%) no se produjo positividad con esta reacción, siendo el total de positivos de 46 (48.4%).

- GL: en 52 VB (54.7%) se produjo la tinción demostrando MAMS de manera focal. Se encontraron en 33 casos (34.7%) con grado 1 o leve (FIGURA Nº 40); con grado 2 en 16 (16.8%) y en 3 (3.1%) con grado 3 o intenso, donde se observa una coloración azul intensa contrastada con el rojo de los núcleos. (FIGURA Nº 41).

De distribución difusa sólo se encontraron 2 casos con grado 1. En 14 (14.7%) no se produjo ningún tipo de positividad. (FIGURA Nº 42)

- SRA: se tiñeron en 30 casos (31.5%) y siempre de modo focal con 21 (22.1%) del grado 1 y 9 casos (9.4%) del grado 2.

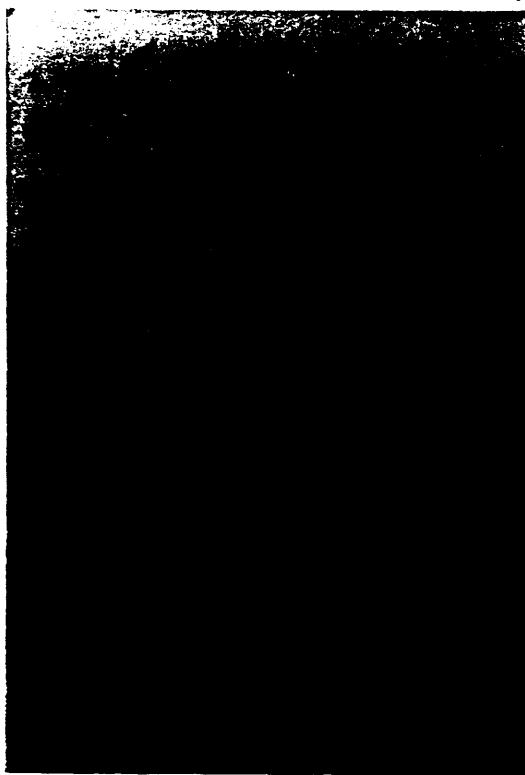


FIGURA Nº 38.- Ausencia de mucinas ácidas muy sulfatadas en el ER y en las glándulas de la colestero-  
losis.  
(AA pH= 0.5. 100 x.)

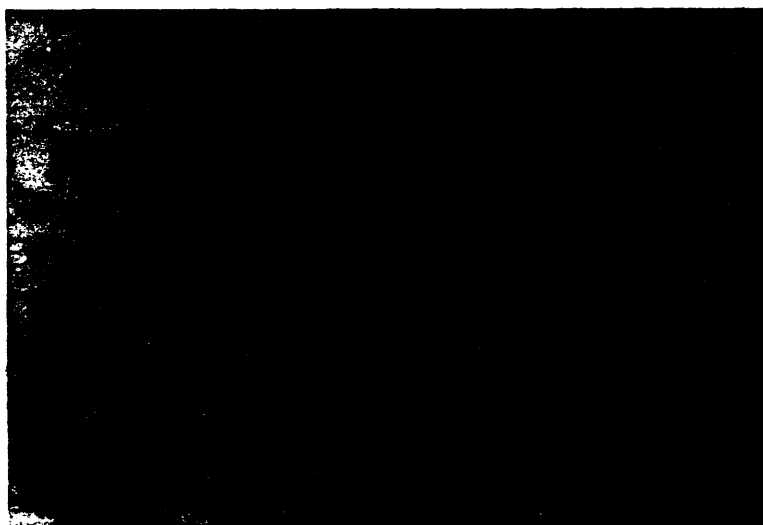


FIGURA Nº 39.- Células caliciformes con mucinas ácidas muy sulfatadas. Discreta positividad en el epitelio de revestimiento.  
(AA pH =0.5. 200 x)

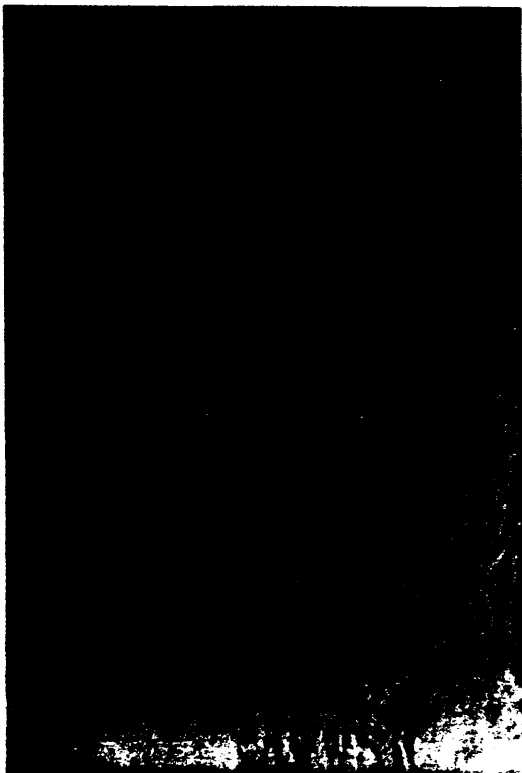


FIGURA Nº 40.- Mucinas ácidas muy sulfatadas de aparición focal en una zona de metaplasia antral.  
(AA pH=0.5. 200 x)





FIGURA N° 41.- Múcinas ácidas muy sulfatadas en las  
glándulas en intensa cantidad.  
( AA pH=0.5. 200 x)

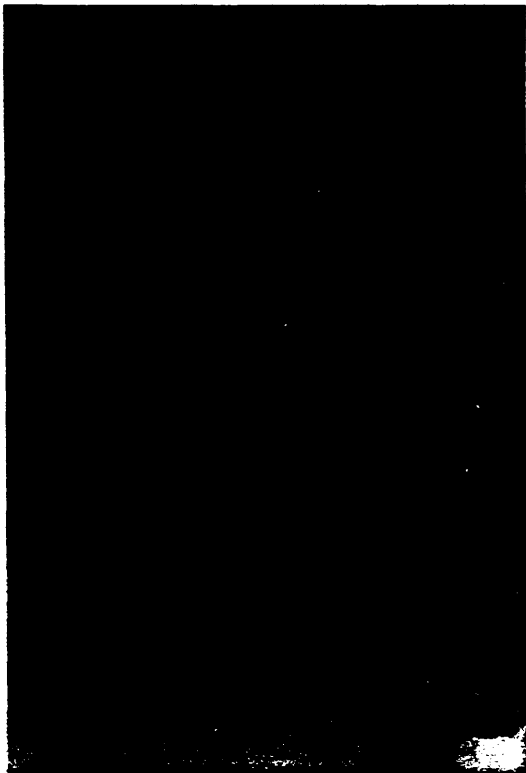


FIGURA Nº. 42 .- Células caliciformes sin mucinas ácidas  
muy sulfatadas.  
(aa pH=0.5. 200 x)

- SL: se tiñen en 5 VB (5.2%) con grado 1 en 2 (2.1%); 2 (2.1%) grado 2 y 1 (1%) grado 3 y siempre de distribución focal.

#### 2.c.2.- VISION CELULAR (CELU):

##### - POLO MUNDIAL (PM).

- ER: tuvo una reacción positiva en 45 VB (47.3%) con patrón granular en todos los casos. (FIGURA Nº 43) La intensidad encontrada fue del grado 1 en 38 (40%) ; grado 2 en 6 (6.3%) y grado 3 en 1 (1%). El resto de las VB fueron negativos con esta tinción.

- GL: en 15 casos (15.7%) no hubo tinción. En 54 (56.8%) se tiñeron y siempre con distribución granular, con grado 1 en 28 (29.4%); grado 2 en 13 (13.6%) y 13 (13.6%) del grado 3.

- SRA: ha habido reacción positiva en 31 casos (32.6%) con un patrón granular en todos ellos. En 19 (20%) del grado 1; en 7 (7.3%) del grado 2 y en 5 (5.2%) del 3. El resto fueron negativos.

- SL: contenían MAMS en 5 ocasiones ( 5.2%) con un grado 1 en 2 (2.1%); 1 (1%) con grado 2 y 2 (2.1%) del grado 3. El resto fueron negativos.

##### - TOTALIDAD CELULAR (TO).

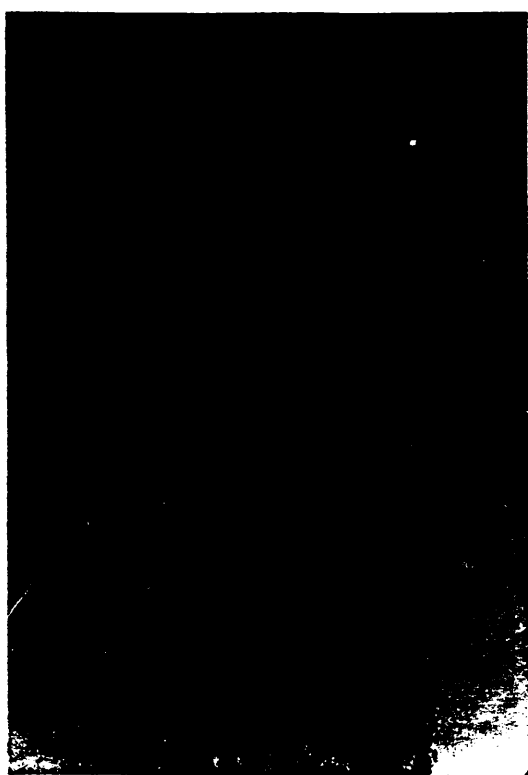


FIGURA Nº 43.- Positividad de modo focal en algunas células del ER de vellosidades, para mucinas ácidas muy sulfatadas localizadas en el polo mundial. (AA pH=0.5. 200 x)

- ER: no se encontró ninguna VB con positividad en toda la célula.
- GL: sólo 1 VB (1%) mostró reacción positiva en este área y con un grado 3 difuso de distribución. El resto resultaron negativas.
- SRA: no hubo ninguna VB positiva.
- SL: no se encontró ninguna célula positiva en este área.

#### 2.d. ESTUDIO CON ALDA-FUC.-

Con esta técnica se pueden diferenciar las MAPS de las MAMS según la tinción sea positiva con el ALDA-FUC o con el AA pH= 0.5, como ya se expuso en el apartado de material y métodos.

Se han considerado en número 93 VB dado que 7 se han descartado por técnica incorrecta.

##### 2.d.1. VISION ARQUITECTURAL (AR):

- ER: se obtuvo tinción positiva en 93 (100%) de los que 64 (68.8%) fue de manera difusa. El grado fue 1 en 45 (48.3%); grado 2 se vió en 18 (19.3%) y 1 (1%) del 3.

El parón focal se encontró en las 29 VB (31.1%) restantes con 22 (23.6%) grado 1; 4 (4.3%) grado 2 y 3 (3.2%) grado 3.

- GL: la reacción fue positiva en 89 VB (95.6%) con aspecto difuso en 62 (66.6%). El grado 1 de intensidad apareció en 31 (33.3%); el grado 2 en 24 (25.8%) y el grado 3 en 7 (7.5%) . Entre las zonas teñidas muy intensamente por contener gran cantidad de MAPS se encuentra la metaplasia antral, que muestra una coloración violácea muy intensa en las áreas positivas. (FIGURA Nº 44)

Con una distribución focal se encontraron 27 (29%) que pertenecían al grado 1 en 17 casos (18.2%); al grado 2 en 5 casos (5.3%) y otros 5 (5.3%) al grado 3. En 4 casos ( 4.3%) la reacción fue negativa con este método.

- SRA: en 15 casos (16.1%) fueron negativos. En 58 (62.3%) fue positiva de modo difuso con un grado 1 de intensidad en 34 VB (36.5%); grado 2 en



FIGURA Nº 44.- Gran cantidad de mucinas ácidas poco sulfatadas en las zonas con metaplasia antral.  
(ALDA-FUC 200 x)

21 (22.5%) y grado 3 en 3 (3.2%).

En 20 VB (21.5%) fue un patrón focal con 15 casos (16.1%) que pertenecían al grado 1; 2 (2.1%) al grado 2 y 3 (3.2%) al grado 3.

- SL: sólo fue positiva la reacción para MAPS en 18 VB (19.3%) con patrón difuso en todos y correspondiendo 4 ( 4.3%) grado 1 y 14 (15%) al grado 2.

#### 2.d.2. VISION CELULAR (CELU):

##### - POLO MUNDIAL (PM).

- ER: fueron positivos los 93 casos (100%) y siempre de manera granular. En 55 (59.1%) se trató de un grado 1; en 28 (30.1%) fue un grado 2 y en 10 (10.7%) del grado 3. ( FIGURAS Nº 45 y 46 )

- GL: fueron 89 casos positivos (95.6%) de patrón granular siempre y con grado 1 en 33 (35.4%); grado 2 en 29 (31.1%) y grado 3 en 27 (29%) Los otros 4 casos (4.3%) fueron negativos.

- SRA: fue reacción positiva para MAPS en 79 VB (84.9%) siempre de modo granular con 44 (47.3%) de grado 1; 24 (25.8%) del 2 y 11 (11.8%) del grado 3. El resto de las 15 VB (16.1%) fueron negativas.

- SL: sólo se evidenció tinción con la técnica AA pH=0.5 en 18 (19.3%) siempre con distribución granular y grado 1 de intensidad en 12 (12.9%); grado 2 en 3 (3.2%) y grado 3 en 3 (3.2%).



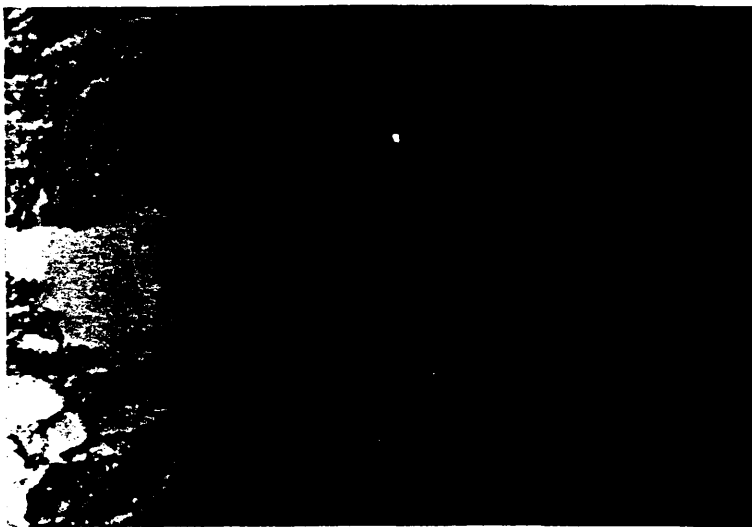


FIGURA Nº 45.- Mínima cantidad de gránulos de mucinas  
ácidas poco sulfatadas en el polo mundial  
del ER en una VB con colesteroles.  
(ALDA-FUC 100 x)

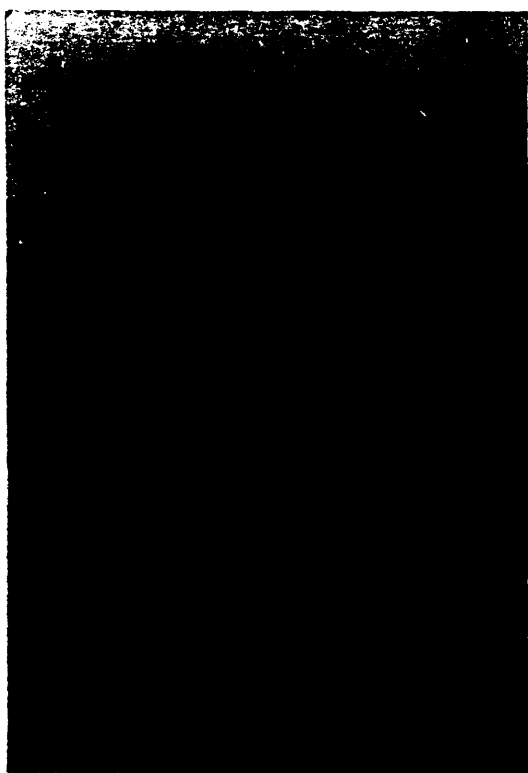


FIGURA Nº 46.- Gránulos con mucinas ácidas poco sulfatadas en el polo mundial del ER.  
(ALDA-FUC 200 x)

- TOTALIDAD CELULAR (T0).

- ER: se tiñeron 6 VB (6.4%) siempre con patrón difuso y grado 3 de intensidad.
- GL: resultaron positivas en 14 casos (15%) también de tipo difuso y grado 3.
- SRA: 3 (3.2%) fueron positivas igualmente con distribución difusa y grado 3 de intensidad tintorial.
- SL: en 1 caso (1%) se tiñó con esta técnica , de manera difusa y grado 3 igual que en el resto de áreas estudiadas.

## 2.e. TIPO DE VB SEGUN CONTENIDO DE MP.-

Dados los anteriores resultados tintoriales, pueden obtenerse datos válidos respecto al contenido de MP en las células de la mucosa de la VB con litiasis y poder conocer el tipo al que pertenecen según la TABLA Nº V. Los patrones encontrados fueron los siguientes, exceptuando 4 VB de las que no se pudo obtener ningún dato válido sobre ello.

- ER: teniendo en cuenta los tipos de MP que contenía esta zona se pueden clasificar en 47 VB que correspondían al tipo D (48.9%) con contenido de MN y MAPS; 45 (46%) tipo E con los 3 tipos de MP; 2 (2%) patrón B; 1 con el C y 1 VB con el H.
- GL: en este estrato fueron 36 VB (37.5%) del tipo D; 54 (56%) del E; en 4 (4.1%) del B; 1 VB del H y 1 del tipo A que no contenía ningún tipo de MP.
- SRA: la mayoría fue del tipo D en 42 ocasiones (43.7%); en 31 (32.2%) del E; en 11 (11.4%) del A; 7 (7.2%) del B y en 5 VB del H (5.2%).
- SL: 78 Vb fueron del tipo A (81.2%), es decir que no contenían ninguna MP o no había SL. En 7 (7.2%) eran del tipo B; en 7 (7.2%) del D; en 2 (2%) del H; en 1 (1%) del E y 1 del F.

La cantidad de MP que poseía cada VB en los diferentes estratos se ha tomado en cuenta y además se ha realizado la media, que depende de la suma de cada una de las MP en cada VB estudiada. Parte de los datos

tomados en cuenta para dicha valoración se muestran en la TABLA N° VII.

- ER: el total de MP en esta zona ha sido de 362 siendo la  $x = 3.77$  con un rango de 1-9 y desviación de 1.84 como se ve en la TABLA .
- GL: el total ha sido de 430 con  $x = 4.77$  y rango de 0-9 con desviación estandar de 2.18.
- SRA: el total ha sido de 296 con  $x = 3.48$  y rango de 1-8.
- SL: el total fue de 38 con rango de 1-4 y  $x = 2.1$ .
- TOTAL MP: tomando en cuenta el total de todas las mucinas, la media ha sido de 11.69 con un rango de 1-24 y desviación estandar de 5.26.

## 2.f. RELACIONES ESTADISTICAS.-

Los datos obtenidos de la cantidad así como de la tipificación de las MP en cada una de las VB se han correlacionado entre sí de modo que se ha llegado a los siguientes resultados estadísticos:

- suma de ER y suma de GL: estas dos cifras tienen una significación estadística de  $p < 0.05$ , siendo la  $r = 0.243$  y la fórmula más adaptada la de correlación lineal :  $y = 2.319 + 0.596x$ . Existe otra curva de tipo logarítmico de  $r = 0.259$  y fórmula  $y = 1.779 + 2.295 \log x$ , que también podría servir como correlación entre ambos factores. (FIGURA Nº 47)

- Total de MP y suma de ER y suma de GL: en ambas relaciones la  $p < 0.001$ . Estos datos son lógicos y esperables puesto que las cifras totales de mucinas dependen de las sumas de GL Y ER, de tal modo que cuando estas aumentan la cifra total también lo hace. Por ello no se ha obtenido la fórmula matemática que los correlaciona puesto que no tiene gran interés.

- MN Y MAMS: si se relacionan las cifras de los resultados de los tipos de MP entre sí vemos que como en este caso existe una  $p < 0.01$  con significación estadística. La  $r = 0.132$  y la fórmula de tipo lineal fue  $y = 0.503 + 0.444x$  que se representa en la FIGURA Nº 48. Sin embargo no tiene una previsión buena aunque podría ser representativa de la función.

- MN Y MAPS: tiene también una  $p < 0.01$  con  $r = 0.155$  y la fórmula de tipo lineal que los correlaciona de  $y = 2.902 + 0.431 x$ . Su previsión tampoco es muy buena pero sirve como representación gráfica, que se muestra en la FIGURA Nº 49.

- MAMS Y MAPS: tiene también una significación estadística con  $p < 0.01$ , una  $r = 0.394$  y la fórmula lineal de  $y = 3.446 + 0.552 x$ . ( FIGURA Nº 50)

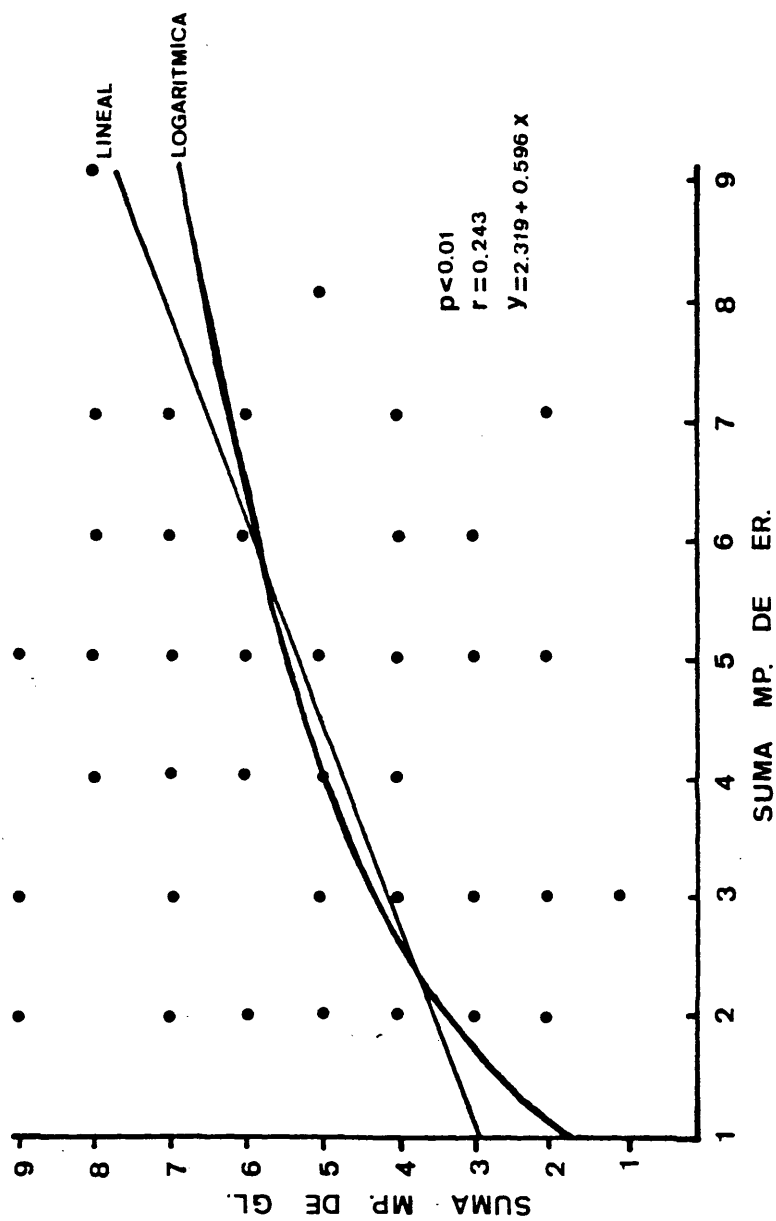


FIGURA Nº 47.- Representación gráfica de la correlación entre la suma de MP en el ER y las GL.

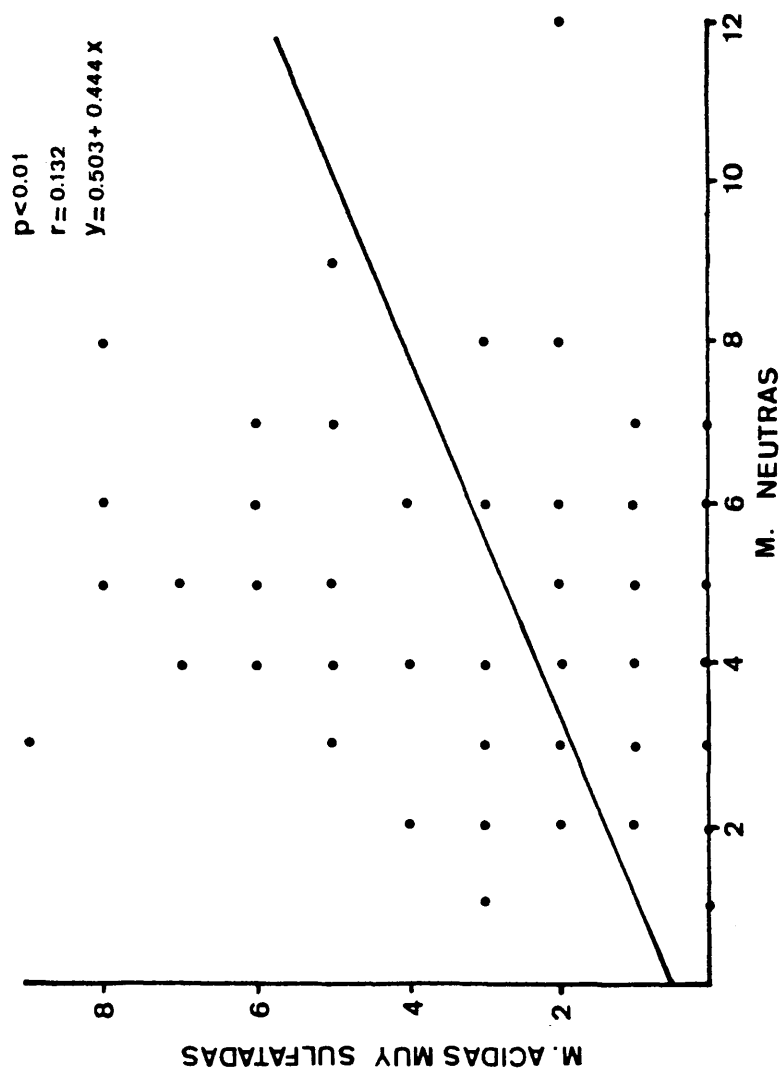
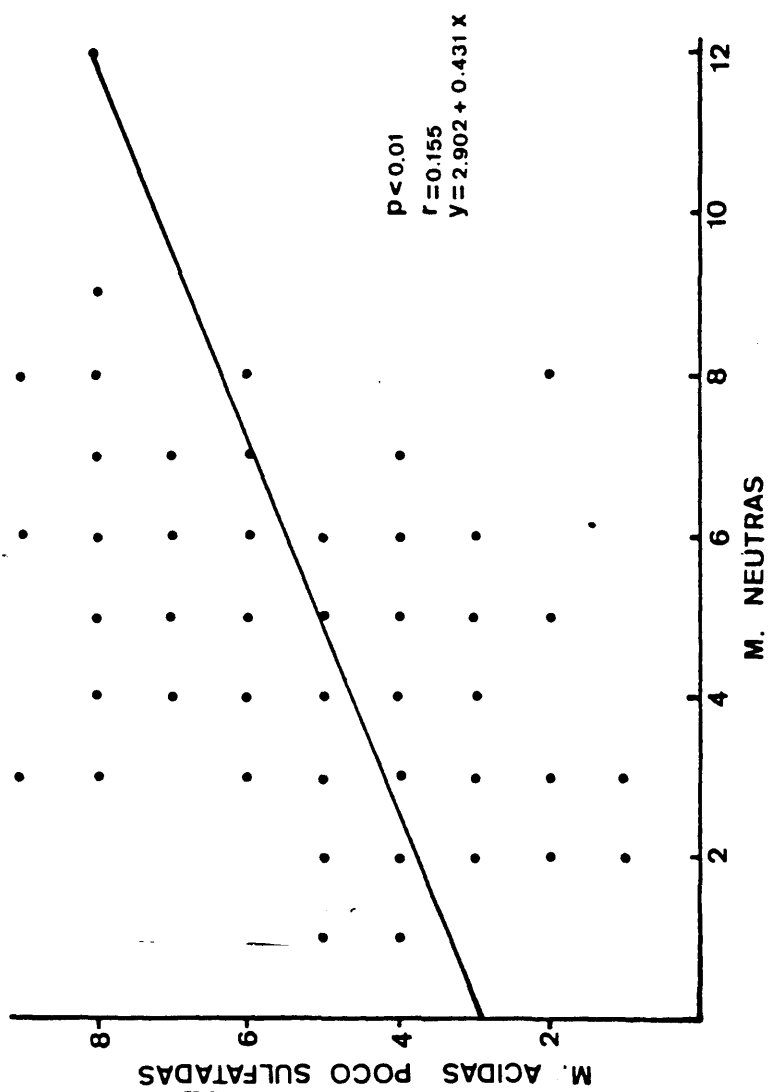


FIGURA N° 48 .- Representación gráfica de la relación entre la cantidad de MN y MAMS.





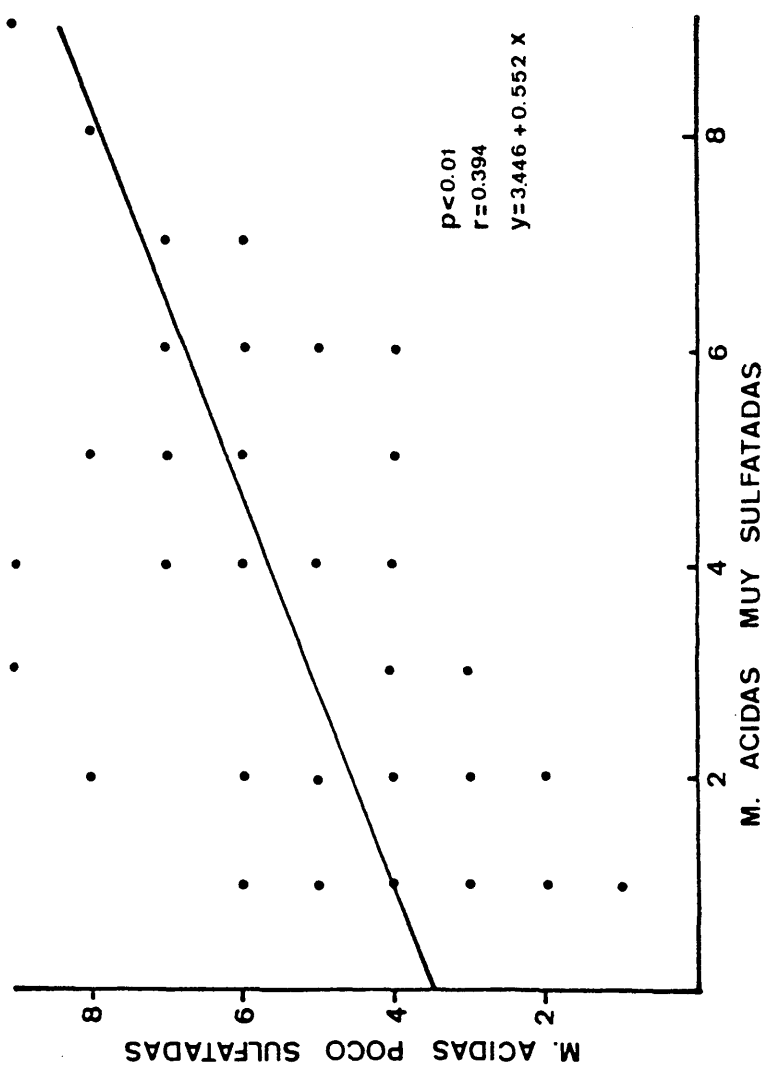


FIGURA N° 50.- Representación gráfica de la relación entre cantidad de MAMS y MAPS.

## II.- ESTUDIO CRISTALOGRAFICO DE LOS CALCULOS.-

#### 1.- ANALISIS MACROSCOPICO.-

El número, tamaño, forma y color de los cálculos son datos importantes pues están relacionados con el tipo y composición. Se ha encontrado un cálculo único en 23 ocasiones (23%) siendo en estas ocasiones de gran tamaño. En un caso llegó a medir 6 x 4.5 cm, semejando un molde de la vesícula. Su forma es ovalada generalmente siendo comparado a una bomba u obús. (FIGURA Nº 51 A)

El número máximo de cálculos de una misma vesícula ha sido de 267 oscilando ampliamente en unas y otras. En el presente estudio sólo se ha valorado desde el cálculo único a más de 10 en cada VB dado que el número mayor no lo consideramos factor importante a analizar. (FIGURA Nº 51 B)

En el 35% de los casos superaban los 10 cálculos, siendo la distribución según el número de cálculos encontrados en cada una de las 100 VB la expresada en la FIGURA Nº 52.

Las formas que se han visto en las concrecciones biliares han sido muy diversas y en ocasiones extrañas y antojadizas (FIGURAS Nº 53 A y B) no pudiéndose incluso ni incluir en ningún grupo concreto morfológico.

Tomando en cuenta la forma y el color existen 3 tipos importantes en la apariencia externa que se corresponden con la composición química del cálculo posteriormente estudiada con otros métodos. Son los siguientes:

#### - CALCULOS DE COLOR NEGRO.-

Se han encontrado 9 cálculos que corresponden al tipo pigmentario y cuyo color externo es el negro. (9% de los casos) Su forma ha sido morular en 5 (FIGURA Nº 54); en 2 ocasiones tetraédricos o abollonados (FIGURA

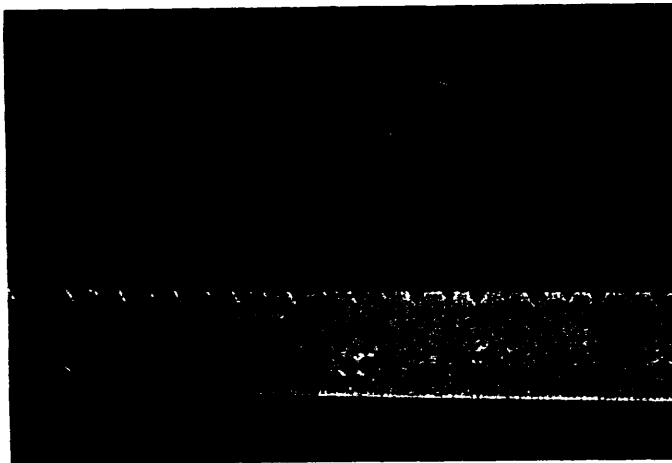


FIGURA Nº 51 A.- Cálculo único de gran tamaño con la forma típica de una bomba.

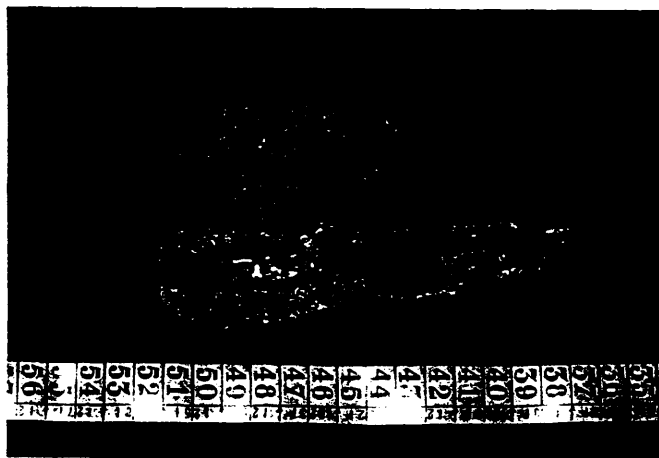


FIGURA Nº 51 B.- VB con su contenido de multitud de cálculos de pequeño tamaño junto a alguno mayor.

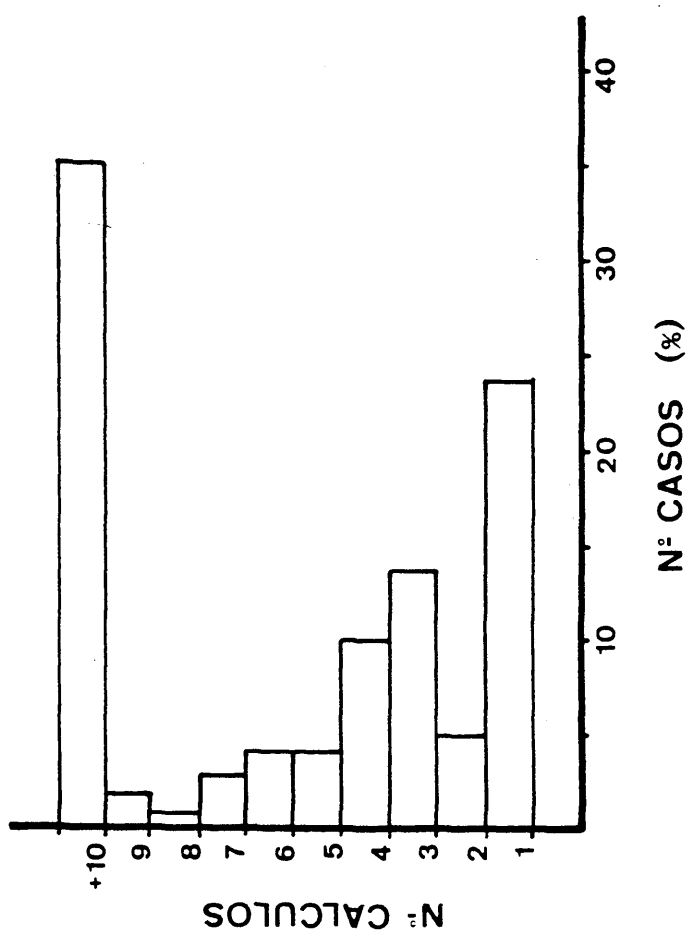


FIGURA Nº 52.- Representación gráfica del número de cálculos encontrados en cada vesícula estudiada.

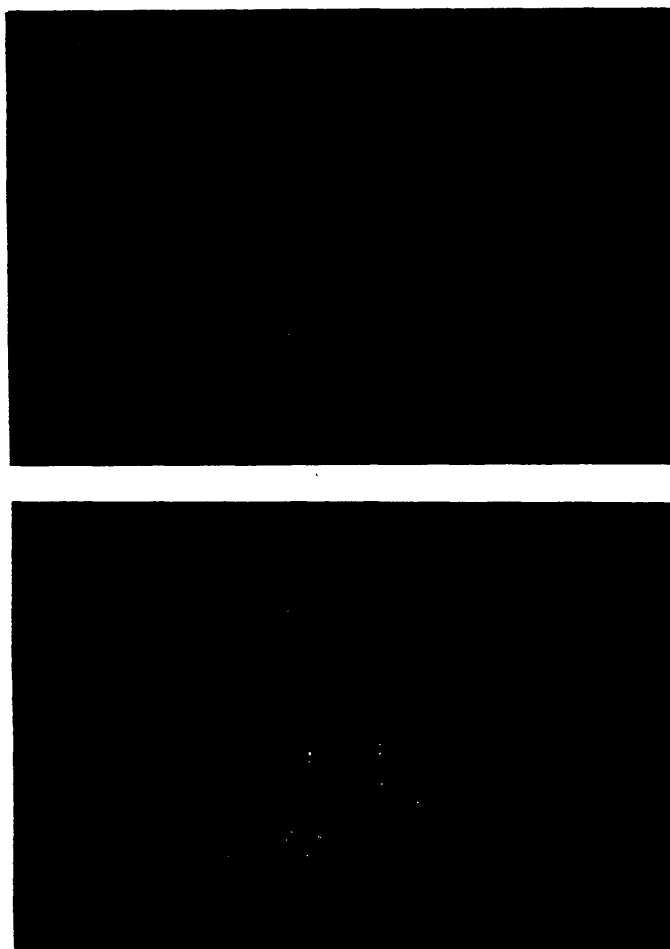


FIGURA Nº 53.- Cálculo de forma extraña y caprichosa.  
En A) se observa una faceta y en B) otra.

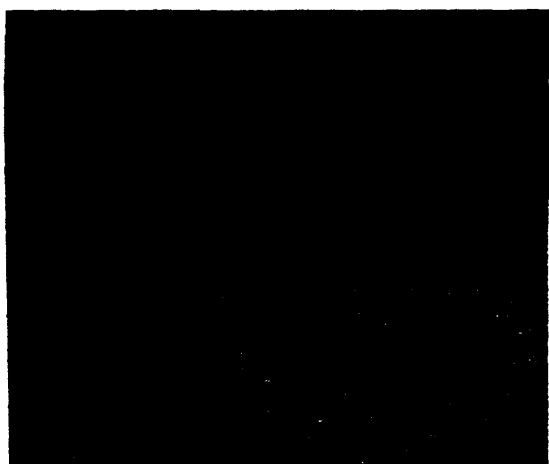


FIGURA Nº 54.- Cálculos de tipo pigmentario de forma morular.

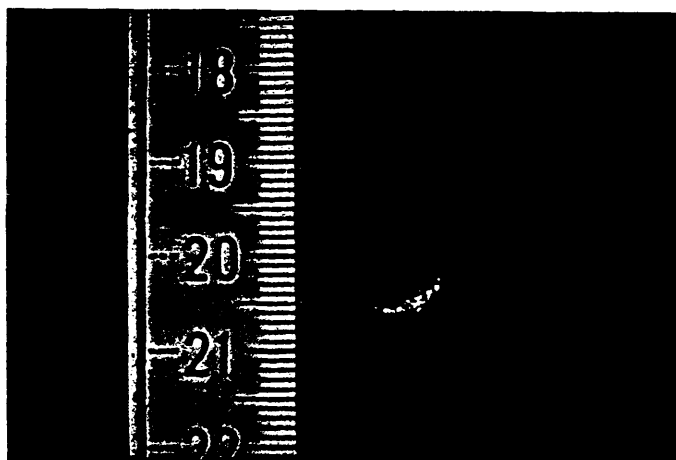


FIGURA Nº 55.- Cálculos de tipo pigmentario con forma abollonada. El color es negro.



Nº 55) y en otras 2 coraliformes de muy pequeñas dimensiones.

Como regla general el tamaño ha oscilado entre 1 y 1.5 cm aproximadamente. En ningún caso fue único oscilando entre 2 y más de 10 con una distribución que se muestra en la FIGURA Nº 56 .-

#### - CALCULOS DE COLOR AMARILLO.-

Estos cálculos corresponden a cálculos de colesterol generalmente, los cuales se han detectado en 6 ocasiones en nuestra serie. (6%) En el 100% han sido múltiples y más de 3. (FIGURA Nº 57 )

La forma ha sido similar a las moras o morular en 1 caso (FIGURA Nº 58 ). El resto tenían una forma irregular aunque en dos ocasiones han sido como cubos o dados de color amarillo casi blanco. (FIGURA Nº 59)

#### - OTROS.

Existe un grupo de color variable entre los marrones, pardos, ocre, terrosos o casi negros. Pertenecen al grupo de cálculos cuya composición es mixta.

A este grupo pertenecen 85 cálculos (85%). En 23 fueron únicos y de gran tamaño. La distribución del número de cálculos encontrados en cada VB cuando eran mixtos se expone en la FIGURA Nº 60 .

En 3 ocasiones (3%) fueron redondeados u ovals con unas dimensiones de 2 x 1.5 cm. y color marrón claro. Pertenecían al tipo de cálculo mixto de combinación que fue confirmado posteriormente por el estudio microscópico y el de fragmentación. (FIGURA Nº 61 )

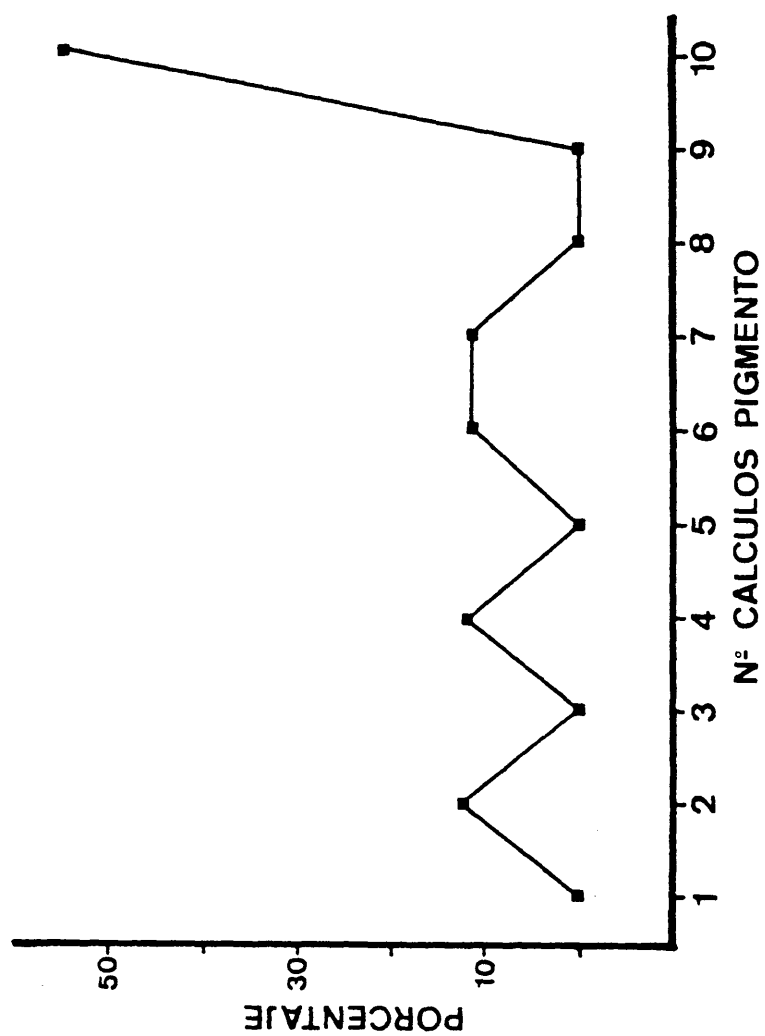


FIGURA Nº 56.- Representación gráfica del número de cálculos en vesículas con cálculos pigmentarios.

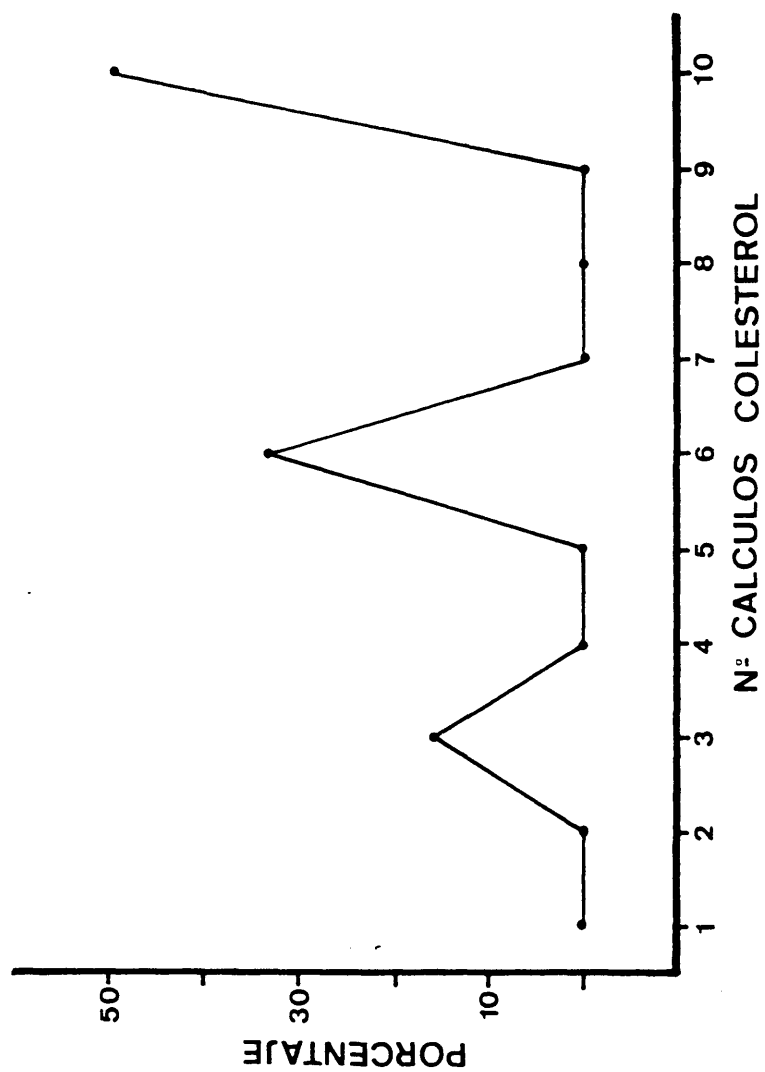


FIGURA Nº 57.- Representación gráfica del número de cálculos encontrados en vesículas con cálculos de colesterol.

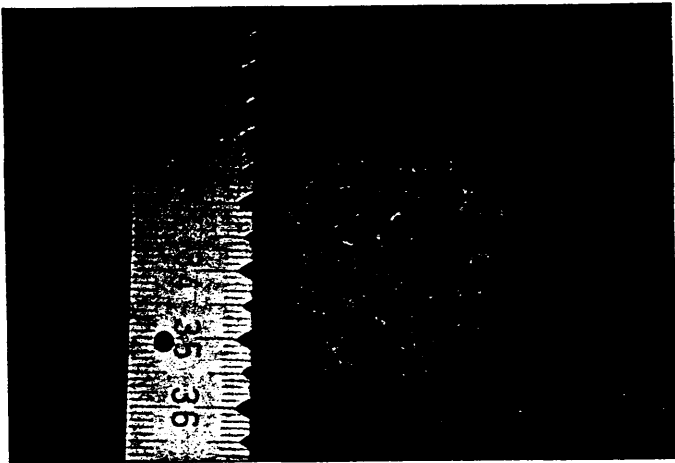


FIGURA Nº 58.- Cálculos de colesterol de forma similar a moras de color amarillo. (Morulares)

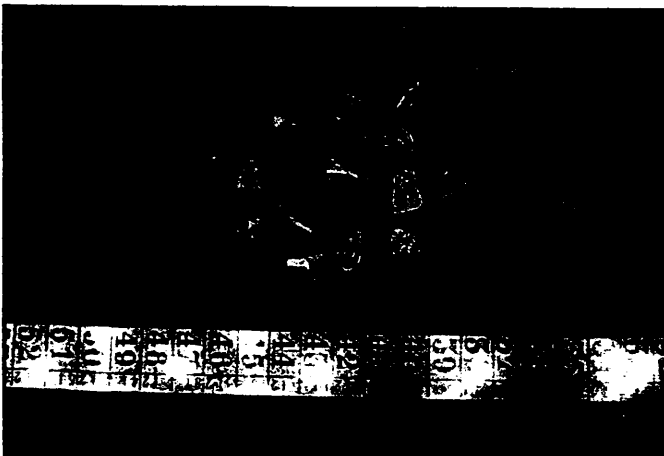
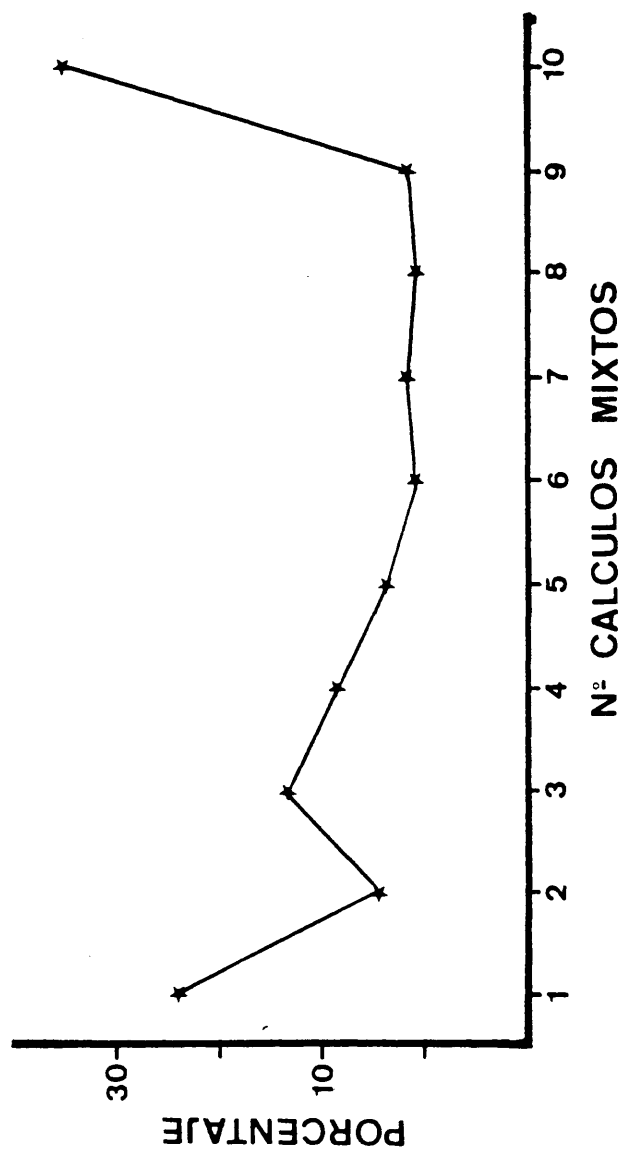


FIGURA Nº 59.- Cálculos de colesterol con el color típico y una forma de dados.



- 244 -

FIGURA Nº 60.- Representación gráfica del número de cálculos en vesículas con cálculos de tipo mixto.

Su forma ha sido generalmente tetraédrica en el 50% o afacetados y siendo todos ellos múltiples y con coloraciones marrones oscuras o casi negros en ocasiones. (FIGURA Nº 62 )

Esta conformación de tetraedro se debe al gran número que habitan una misma VB, obligándolos a colocarse en una disposición apiñada, quedándose marcadas sus caras entre sí. Casi siempre presentan una cara convexa que corresponde a la que contacta con la VB y otra más cóncava que es la que toca con el resto de los cálculos.

En 8 (8%) eran casi de aspecto cúbico y en 20 del tipo denominado cantos rodados. Estos corresponden a cálculos de gran tamaño que coexisten junto a otros más pequeños en la VB, teniendo todos la misma coloración. (FIGURA Nº 63 )

Cálculos del tipo denominado compuesto se han visto en 7 casos (7%), y corresponden a conglomerados de cálculos más pequeños que parecen haberse unido o cimentado formando otros mayores. (FIGURA Nº 64 )

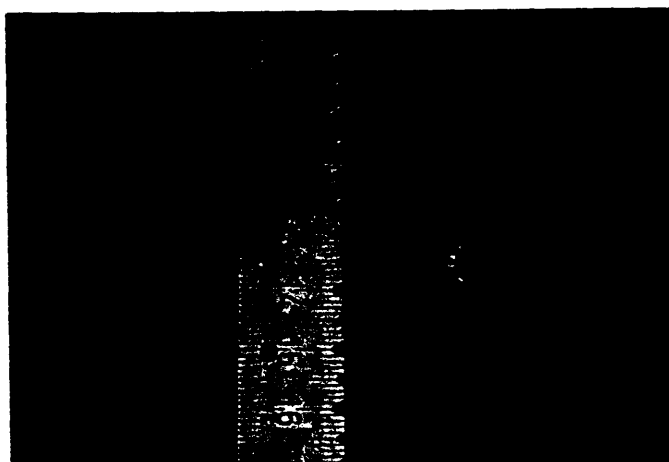


FIGURA Nº 61 .- Cálculo mixto de combinación, con forma redondeada y color marrón no muy oscuro.

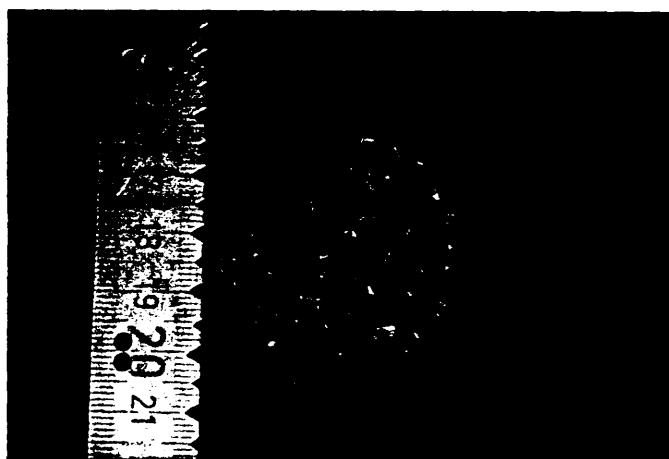


FIGURA Nº 62 .- Cálculos mixtos numerosos y de forma típica. Presentan unas caras afacetadas y un color marrón oscuro.

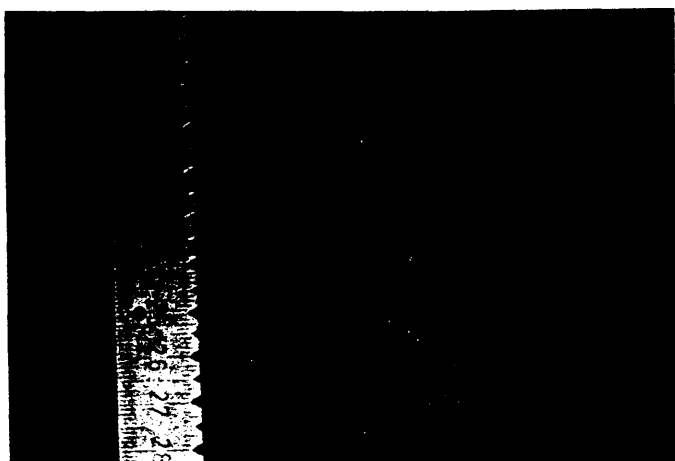


FIGURA Nº 63 .- Cálculos del tipo mixto y denominados cantos rodados por ser grandes y pequeños con el mismo color y apariencia.



FIGURA Nº 64 .- Tipo de cálculos mixtos compuestos, ya que parecen formarse de unos más pequeños.



## 2.- ESTUDIO DIRECTO POR FRAGMENTACION.-

Tras la fragmentación del cálculo y el análisis por estereomicroscopía de lupa se han determinado los tipos de cálculos siguiendo la clasificación ya citada en el apartado de métodos. Han coincidido con el tipo sospechado mediante la visualización externa en el 100% de los casos.

Con este método los hallazgos obtenidos han sido los siguientes:

### - CALCULOS PIGMENTARIOS:

Este tipo de cálculos tras la fragmentación sufren la destrucción casi total deshaciéndose y quedando convertidos en partículas de polvo. (FIGURA Nº 65)

Debido a que no poseen estructura ninguna al corte presentan un aspecto amorfo y de color negro (FIGURA Nº 66 ) en el que no pueden distinguirse partes. Esto representa una diferencia entre los que son de color negro y pigmentarios de los que son también negros en el exterior pero son de composición mixta.

### - CALCULOS MIXTOS Y DE COLESTEROL:

En el corte se pueden considerar con características similares tanto los cálculos mixtos como los puros de colesterol, y por ello se estudian dentro del mismo apartado.

Presentan una textura blanda con 3 zonas diferenciadas. El aspecto interior es amarillento y no pueden deshacerse como ocurre con los pigmentarios.



FIGURA Nº 65.- Cálculos pigmentarios tras la fragmentación.  
Quedan convertidos en mínimas partículas.

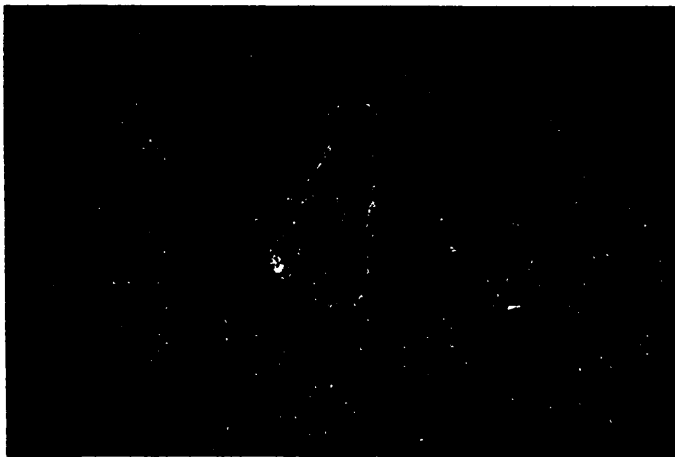


FIGURA Nº 66 .- Sección de un cálculo pigmentario. Su interior es de color negro y sin estructuración.

Al corte presentan una coloración amarillenta con un aspecto brillante que corresponde a los cristales de colesterol. (FIGURA Nº 67 ) En los de colesterol puro el interior es amarillo claro y se distinguen muy claramente las zonas del cálculo. (FIGURA Nº 68 ) En los mixtos existen zonaciones más oscuras no uniformemente repartidas, con excepción de los mixtos de combinación en los que las alternancias de bandas amarillas claras y marrones son casi perfectas.

Las 3 partes identificadas son:

1) NUCLEO CENTRAL:

Representa el inicio de la formación del cálculo y es de un color más oscuro dado que se compone de pigmento o bilirrubinato cálcico junto a otro tipo de sustancias amorfas y no determinadas.

2) CUERPO:

Es la parte media y en ella se van aponiendo sustancias que proporcionan el crecimiento del cálculo. Difiere según el tipo de cálculo corresponda al de colesterol o mixto. En el primer tipo esta zona es de color amarillo claro como se ha visto en la FIGURA Nº 68 . En los segundos es más oscuro y alternando con zonas claras que según sea de combinación o no, tomará o no una disposición en capas de manera simétrica.

3) CORTEZA:

Es la capa externa en la que se detiene el crecimiento, por lo que es ligeramente más dura y a veces más oscura que el resto de las otras capas.

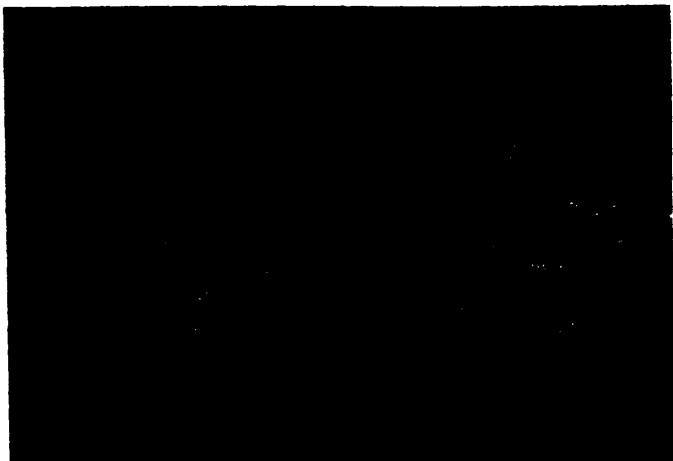


FIGURA Nº 67.- Sección de un cálculo de colesterol, mostrando la disposición radial y brillante de los cristales de colesterol.



FIGURA Nº 68.- Cálculos de colesterol puro seccionados, en los que se ve la coloración amarillenta y las diferentes partes del mismo.

### 3.- ANALISIS MICROSCOPICO.-

#### 3.1. CUANTITATIVO.-

Los resultados del conteo de los cristales que componen cada uno de los 100 cálculos de la serie estudiada se muestra en la TABLA N° IX .

Los 6 cálculos de colesterol, contenían más del 75% de cristales de colesterol, siendo el rango en el que oscila entre 82 y 92 con  $x = 87$  y desviación estándar de 3.68. La cantidad del pigmento fue de 5-15% con  $x = 10.16$  y desviación estándar de 4.49. La relación entre ambos factores ha resultado positiva siendo estadísticamente significativa pues la  $p < 0.01$ . La recta que los correlaciona es de tipo lineal con fórmula de  $y = 95.07 - 0.79 x$  y la  $r = 0.96$ . (FIGURA N° 69 )

La sustancia residual en los 6 cálculos de colesterol ha oscilado entre 1-3 con  $x = 2$  y desviación de 0.89. Relacionando la sustancia residual con el pigmento no se ha encontrado ninguna dependencia estadística significativa.

Los cálculos que corresponden al tipo pigmentario tienen más del 75% de cristales de bilirrubinato cálcico. Su rango osciló entre 74-90% con  $x = 81.55$  y desviación de 5.10. El número de cristales de colesterol en ellos tuvo un rango de 7-12% con  $x = 9.44$  y desviación de 1.87. No se ha encontrado relación estadística entre el contenido de colesterol y bilirrubinato en los cálculos pigmentarios.

La sustancia residual en los 9 cálculos con predominio de pigmento osciló entre 0-16 con  $x = 7.88$  y desviación de 6.41. Cuando se relaciona esta sustancia con el % de bilirrubinato se obtienen diferentes tipos de correlaciones significativas estadísticamente, siendo la más adecuada la de tipo lineal con  $p < 0.005$  (0.003333) y fórmula de la recta de  $y = 102.848 - 1.164 x$ . (FIGURA N° 70)

TABLA Nº IX.- Resultados del análisis cristalográfico con el método de lámina delgada de los 100 cálculos que componen la muestra con la edad del paciente al que corresponde cada uno.

Nº CALCULO	COLESTEROL	BILIRRUBINATO	CO <sub>3</sub> CA	RESIDUO	EDAD
1	64	34	0	2	46
2	36	61	0	3	28
3	44	46	0	10	63
4	90	5	2	1	56
5	8	85	1	6	68
6	36	61	0	3	56
7	45	51	3	1	27
8	28	71	0	1	55
9	32	61	1	6	60
10	85	13	0	2	69
11	70	28	0	2	62
12	26	72	0	2	32
13	56	43	0	1	87
14	63	35	0	2	76
15	58	39	0	3	70
16	64	31	0	5	40
17	11	64	5	0	56
18	70	28	0	2	59
19	38	61	0	1	63
20	60	32	0	8	29
21	55	43	0	2	74
22	8	90	2	0	49
23	46	53	0	1	41
24	53	45	0	2	74
25	60	35	1	3	69
26	47	53	0	0	37
27	57	42	1	0	63
28	42	58	0	0	51
29	37	58	0	5	35
30	48	44	2	6	53
31	40	55	0	5	52
32	72	24	0	4	50
33	85	14	0	1	52
34	71	29	0	0	80
35	46	53	0	1	71

Nº CALCULO	COLESTEROL	BILIRRUBINATO	CO <sub>3</sub> CA	RESIDUO	EDAD
36	59	35	0	6	74
37	82	15	0	3	64
38	47	43	0	3	40
39	63	35	0	2	31
40	58	40	0	2	63
41	53	42	2	3	70
42	44	43	1	12	59
43	32	64	3	1	49
44	58	41	0	1	48
45	66	28	0	6	63
46	68	30	2	0	29
47	63	35	0	2	40
48	92	5	1	2	50
49	33	61	0	6	49
50	72	27	0	1	55
51	63	36	0	1	41
52	70	25	2	1	34
53	7	78	0	15	35
54	12	82	0	6	55
55	62	36	0	2	49
56	70	30	0	0	73
57	72	24	0	3	26
58	10	74	0	16	61
59	63	22	0	5	51
60	68	30	0	2	38
61	64	30	0	6	52
62	71	28	1	0	56
63	69	21	0	10	62
64	61	39	0	0	75
65	8	75	1	16	69
66	71	29	0	0	59
67	68	32	0	0	57
68	47	53	0	0	69
69	69	28	0	3	81
70	72	26	0	2	74



Nº CALCULO	COLESTEROL	BILIRRUBINATO	CO <sub>3</sub> Ca	RESIDUO	EDAD
71	58	41	1	0	30
72	41	58	0	1	60
73	63	31	0	4	61
74	12	84	0	4	61
75	56	44	0	0	40
76	62	33	0	5	46
77	64	36	0	0	62
78	60	37	0	3	67
79	88	9	0	3	72
80	64	36	0	0	42
81	71	27	0	2	55
82	36	63	0	1	51
83	49	45	0	6	43
84	58	61	0	3	63
85	60	45	0	5	50
86	43	47	2	8	63
87	52	36	1	11	27
88	57	42	1	0	53
89	51	48	1	0	53
90	73	27	0	0	64
91	62	21	0	17	50
92	67	26	0	7	53
93	68	31	0	1	65
94	71	21	0	8	59
95	74	18	2	6	62
96	74	18	2	6	65
97	68	27	1	4	60
98	42	55	0	3	62
99	9	82	1	8	75
100	59	39	0	2	73

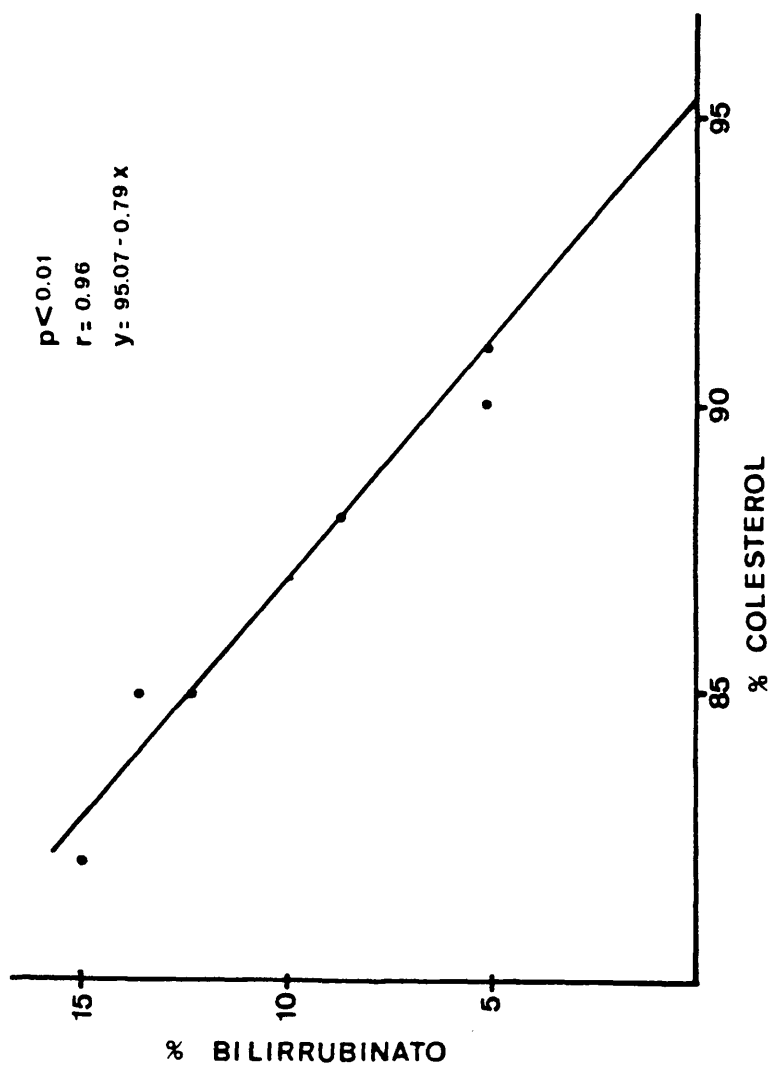


FIGURA Nº 69.- Representación de la relación entre contenido de colesterol y bilirrubinato en los 6 cálculos de colesterol.

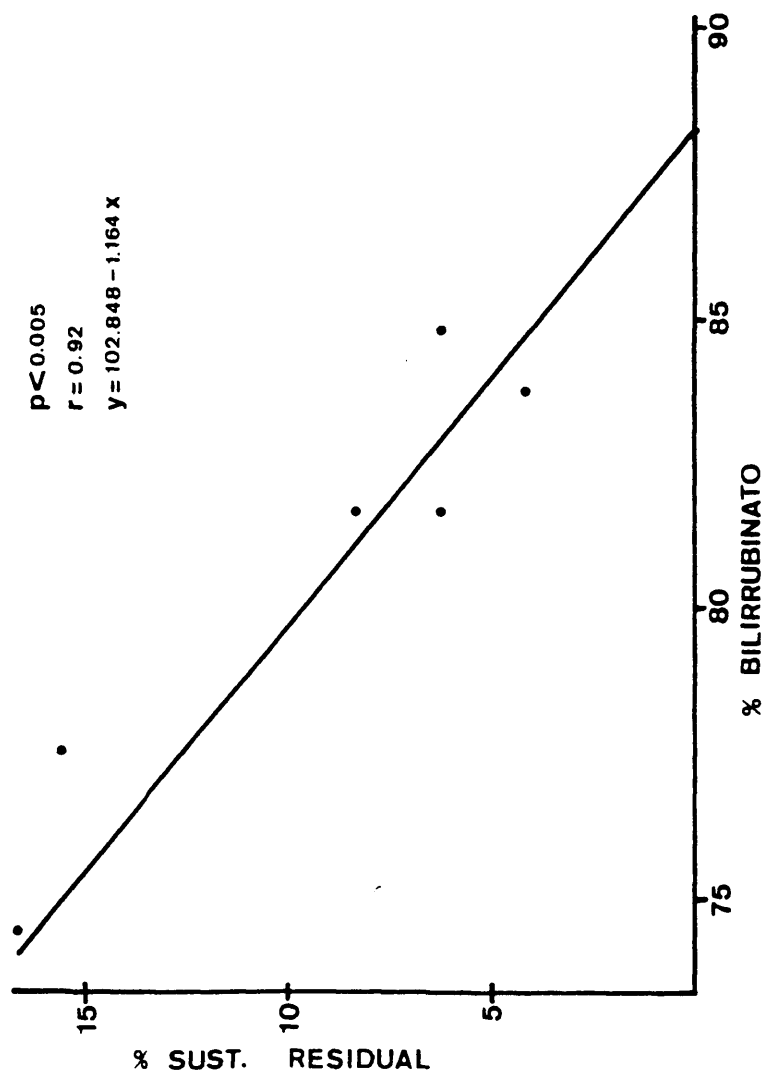


FIGURA N° 70.- Representación de la relación estadística entre la cantidad de bilirruberinato y la sustancia residual en los 9 cálculos pigmentarios.

El contenido de  $\text{CO}_3\text{Ca}$  fue en los cálculos pigmentarios de 0-5,  $x = 1.11$  y desviación de 1.61, no hallando relación estadística entre este componente y el porcentaje de bilirrubinato.

En los 3 cálculos de combinación el contenido de colesterol osciló en un rango de 5-74 con  $x = 63$  y desviación de 11.53. El pigmento de 18-48 con  $x = 33.33$  y desviación de 15.01 siendo la relación entre ambos factores no significativa. (FIGURA Nº 71 )

En 2 de los cálculos de combinación existió sustancia residual y en 2  $\text{CO}_3\text{Ca}$  con cifras que se exponen en la TABLA Nº IX.

Los cálculos mixtos son los considerados como no incluidos en los dos grupos anteriores y cuyo porcentaje de colesterol es menor del 75% y menos de 75% de bilirrubinato cálcico. Son en total 85 contando con los 3 de combinación pues sus diferencias han sido morfológicas y cristalográficas pero no composicionales.

El colesterol en los 82 cálculos mixtos ha oscilado entre 28-74 siendo la  $x = 56.92$  y la desviación estándar de 12.44. El contenido de pigmento fue de 18-72 y  $x = 39.87$  con desviación estándar de 13.28. La relación entre colesterol y pigmento en este tipo de cálculos ha tenido significación estadística con  $p < 0.0001$ .

Cuando se practica la correlación entre estos dos componentes en los 100 cálculos se obtiene así mismo una significación estadística de  $p < 0.001$ . El rango total de cristales de colesterol osciló entre 7-92,  $x = 54.6$  y desviación de 19.77. El bilirrubinato osciló entre 5-90,  $x = 41.72$  y desviación de 18.88. La  $p$  corresponde a  $0.32 \times 10^{-52}$  y la fórmula con  $p$  más significativa y fiable corresponde a la de una correlación lineal de  $y = 92.262 - 0.926 x$ . Existen otras correlaciones menos fiables, como muestra la FIGURA Nº 72.

La sustancia residual en los cálculos mixtos tuvo un rango de 0-17,  $x = 3.26$  y desviación de 3.33 sin hallarse correlación entre ella y el contenido de bilirrubinato.

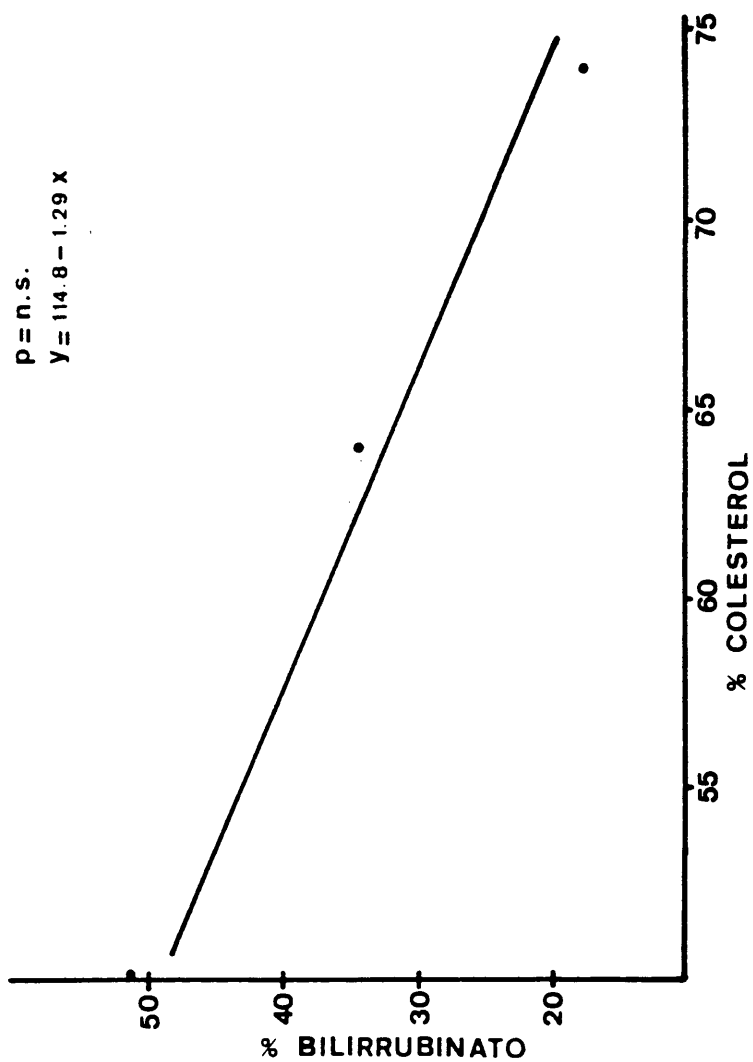


FIGURA Nº 71.- Representación de la relación entre el contenido de colestero y bilirrubinato en los 3 cálculos de combinación.

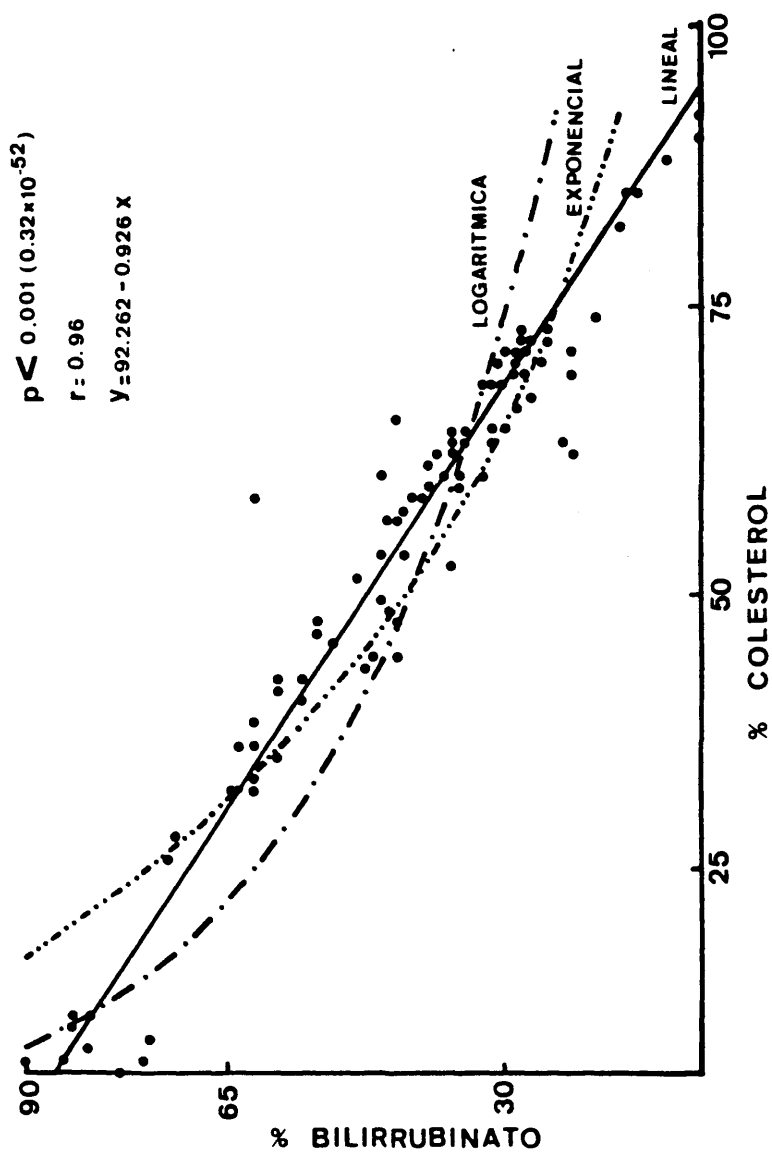


FIGURA N° 72.- Representación de la relación entre contenido de colesterol y bilirrubinato en los 100 cálculos.

El  $\text{CO}_3\text{Ca}$  ha sido el tercer componente de los cálculos y se ha encontrado en 27 (27%) aunque sea en escasas cantidades. No se ha observado ningún cálculo de carbonato puro, pues se considera que para serlo debe contener más del 10% de este componente y en nuestra serie ningún cálculo cumple este requisito. En los 27 osciló entre 1-5 su contenido siendo en 2 casos cálculos de colesterol, 5 fueron pigmentarios; 2 de combinación y 18 mixtos. Es decir, que el 33% de los de colesterol lo poseía, el 55% de los pigmentarios, el 66% de los de combinación y sólo el 21.9% de los mixtos. En los 20 cálculos mixtos y de combinación el rango fue de 1-3, la  $\bar{x}$  = 1.55 y la desviación estandar de 0.68 con una relación con el colesterol sin significación.

### 3.2. CUALITATIVO.

El estudio morfológico al microscopio con el sistema de la lámina delgada ayuda al conocimiento de la organización y estructura cristalográfica del cálculo.

Se pueden distinguir 3 ordenaciones distintas según el cálculo contenga colesterol mayoritariamente; sea pigmentario o mixto de combinación. Por ello los resultados se especifican en 3 apartados:

#### - CALCULOS CON CONTENIDO EN COLESTEROL:

En este tipo de cálculo se evidencian 3 capas que corresponden a los periodos de formación de los mismos tal como se puede observar en la FIGURA Nº 73 .

En la zona central o del núcleo se detectan cristales de colesterol junto a pigmento de color marrón con sustancias de tipo fibroso, además de algún fosfato.

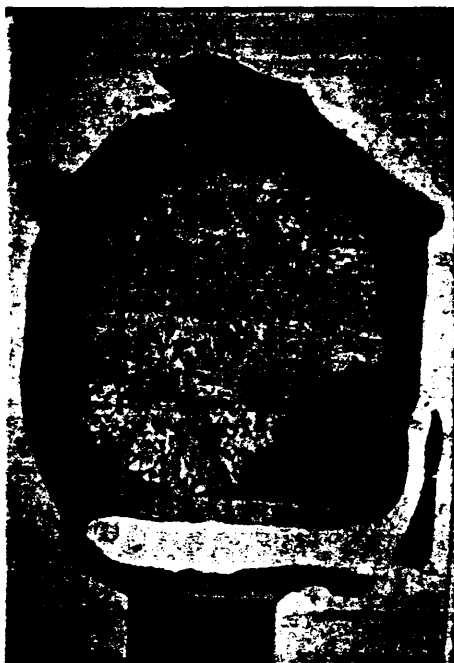


FIGURA Nº 73.- Cálculo de colesterol seccionado. (Técnica de lámina delgada.) Se observan las 3 partes del cálculo.



El cristal de colesterol se muestra a semejanza de tabloncillos de unas dimensiones entre 0.1 micras a 3-4 mm. que adoptan una disposición paralela y que puede ir aponiéndose entre sí para dar otros mayores. Esta distribución y forma es la descrita en la literatura siendo de color blanquecino o transparente con la luz normal. Estos cristales en los cálculos de colesterol puro o con predominio del mismo, se conforman como radios que parten de un núcleo constituido por bilirrubinato. En conjunto muchos de estos núcleos darían el cálculo macroscópico. (FIGURA Nº 74 ) Cuando se observa a gran detalle (FIGURA Nº 75 ) se pueden detectar además restos de material amorfo entre las tabletas del colesterol. El bilirrubinato cálcico se sitúa entre las mismas con una coloración marrón. Se ha comparado la imagen que produce a la de las varillas de un abanico a las plumas. Sólo en el caso de que existan varios núcleos, como ya se ha comentado, los tabloncillos de colesterol se entrecruzan rompiendo su paralelismo. Si la cristalización no es uniforme se encuentran cristales de gran tamaño junto a otros más pequeños.

Cuando se aplican los nicols cruzados para la visualización de un cálculo puro de colesterol se observan los colores de interferencia debido a la desviación sufrida por la luz, tomando unas tonalidades azuladas-verdosas, como se ve en la FIGURA Nº 76 , donde además puede apreciarse claramente la ordenación paralela de los cristales de colesterol y que el pigmento al acumularse entre ellos define los contornos de los mismos.

Si se introducen los sistemas modificadores del haz luminoso como la lámina compensadora de rojo de primer orden, se colorean en tonalidades rojizas o violáceas, los cristales de colesterol cuya orientación coincide con la de dicha lámina y que corresponde a una inclinación de 45º sobre el plano. De esta manera se puede determinar la disposición espacial de los cristales según la coloración que adopten. (FIGURA Nº 77 )

Si el cálculo posee colesterol pero es del grupo mixto, la coloración de las tabletas de colesterol es más irregular, estando aglomeradas. Su tamaño varía (FIGURA Nº 78) y el pigmento que corresponde en su mayoría a bilirrubinato de calcio aparece más abundantemente. Este pigmento posee unas coloraciones amarillentas o marrones que lo identifican. Los tonos más claros corresponden a menor espesor de sustancia. La intensidad del color dependerá

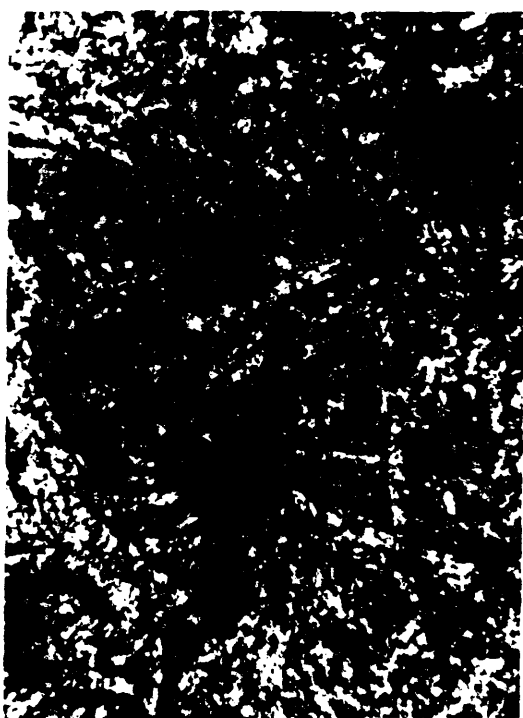


FIGURA N° 74 .- Cálculo de colesterol visto a 160 x.  
Las láminas del colesterol sirven de gérmen  
unas a otras. Existen cristales de distintos  
tamaños colocados de forma radial.

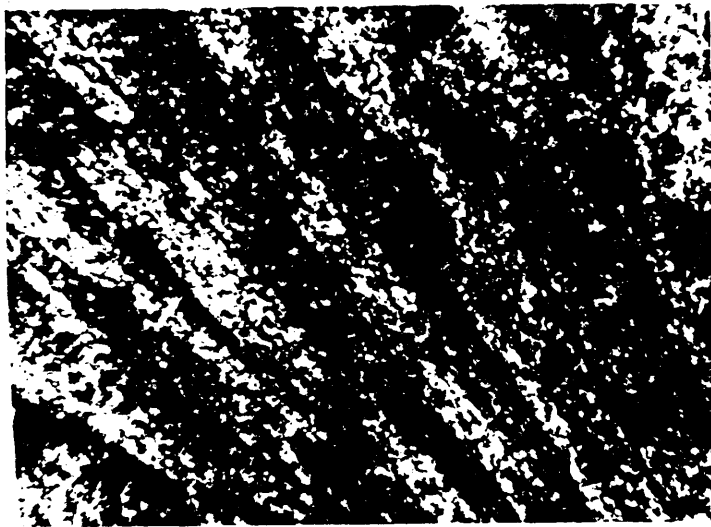


FIGURA Nº 75 .- Cálculo de colesterol .(400 x)  
Detalle de los cristales de colesterol yuxtapuestos como fibras y confluyendo de modo radial . (Flecha) Se observa material negro o sutancia residual y manchas de pigmento.



FIGURA Nº 76 .- Cálculo de colesterol. (400 x.Nicoles cruzados)  
Enormes cristales de colesterol con sus colores  
de interferencia. El pigmento marca sus bordes  
perfectamente.(flechas)

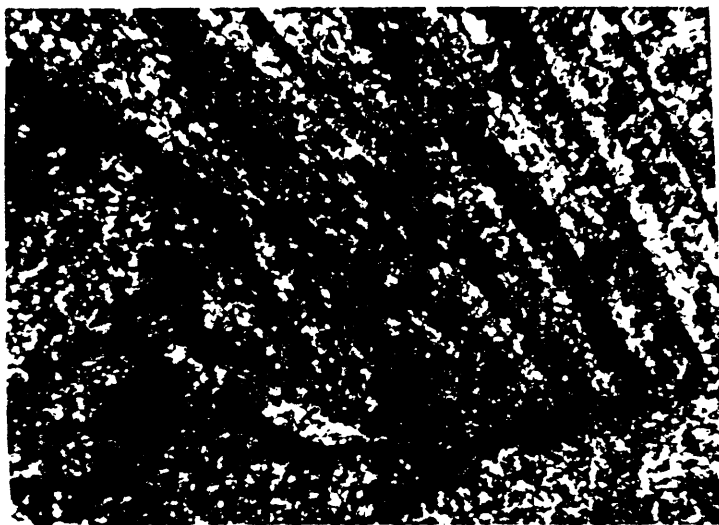


FIGURA Nº 77 .- Cálculo de colesterol.(160 x. Nícoles cruzados y lámina compensadora de rojo de 1º orden)  
Disposición paralela del colesterol. Se reconocen sus típicos colores de interferencia azules y en rosado cuando coincide con la lámina. El pigmento aparece en marrón.

por tanto del espesor así como de la concentración del mismo. (FIGURA Nº 79 ) La afinidad química que posea con las proteínas, los mucopolisacáridos y las sustancias del cálculo también influyen en este dato.

El pigmento en este tipo de cálculos tiene predominancia en el núcleo, de modo que el 87% de los mismos lo han presentado a ese nivel. En la sección del cálculo se puede observar el núcleo con una coloración más oscura que el resto (FIGURA Nº 80 ) y que se observa mejor aumentando la resolución del microscopio. (FIGURA Nº 81 )

En la corteza tanto de los cálculos de colesterol como de los mixtos también se encuentra en mayor cantidad produciendo una línea más oscura que se ve al corte. (FIGURA Nº 80 )

En la zona media del cálculo, el pigmento y el colesterol alternan sin distribución determinada cuando se trata de cálculos mixtos, observándose al microscopio como bandas de color marrón-amarillento y otras de color blanquecino que corresponden al colesterol. (FIGURA Nº 82 ) Se introduce el pigmento entre los cristales del colesterol pudiéndoles teñir en superficie con lo que toman un tono amarillento en lugar de blanco.

En las zonas en las que parece haberse detenido el crecimiento, se sitúa el pigmento apareciendo como de color casi negro y más difuminado en el borde. Las capas que se van aponiendo son más numerosas en pigmento conforme se avanza hacia la superficie, siendo menores en contenido de colesterol. Cada una es considerada como un estadio en el desarrollo del cálculo. (FIGURA Nº 83)

Si introducimos la lámina roja de primer orden, pueden observarse diferentes coloraciones, según sean cristales de colesterol ( en color azul) o cristales pero en la misma dirección que la lámina, que darán color rosado, con el pigmento en amarillo-marrón y sustancia amorfa o residual en color negro. (FIGURA Nº 84 ) Ello refleja la complejidad de elementos que se reúnen en un cálculo, y su complicada disposición espacial.



FIGURA Nº 78..- Cálculo mixto. (160 x)  
Aglomeración de cristales de colesterol sin orden determinado y de diferentes tamaños y entre ellos el pigmento.



FIGURA Nº 79 .- Cálculo mixto. (400 x)  
Detalle del badeado pigmentario alternando con zonas de colesterol. La diferente tonalidad depende de la concentración de pigmento. Como manchas negras aparece la sustancia residual.





FIGURA Nº 80 .- Cálculo mixto al corte. (Lámina delgada)  
Se pueden observar las 3 zonas del cálculo,  
con el núcleo en negro; la zona media en ca-  
pas y la corteza como una línea oscura.



FIGURA Nº 81 .- Cálculo mixto. (400 x)  
Núcleo de cristalización teñido por pigmento que  
aparece en marrón. Alrededor se observan crist  
les de colesterol como una corona.

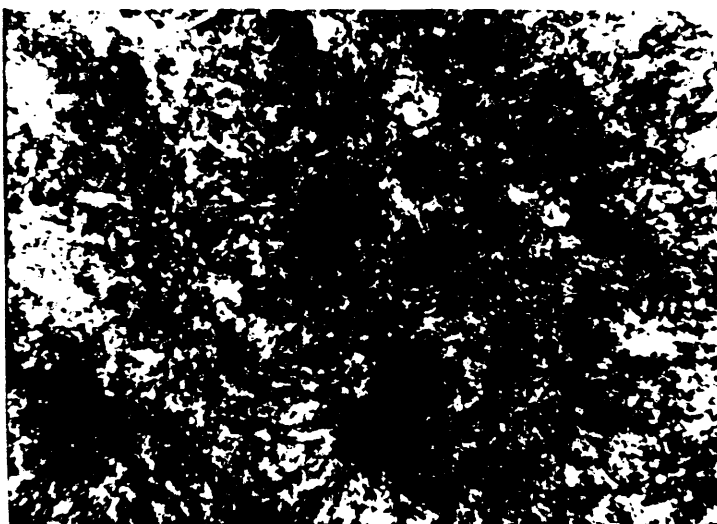


FIGURA Nº 82.- Cálculo mixto. (160 x)  
Bandeados pigmentarios y de colesterol. Se evidencian cristales de carbonato en color rosado, impregnando a los de colesterol. (Círculo)



FIGURA Nº 83.- Cálculo mixto. (160 x)  
Efecto de abanico de los cristales de colesterol con depósito de pigmento sobre ellos. El gérmen parece ser materia residual. (Círculo)



FIGURA Nº 84 .- Cálculo mixto.(400 x. Nicoles cruzados y lámina compensadora de 1º orden)  
Detalle de un acúmulo de pigmento con sutancia residual, junto a cristales de colesterol con sus colores azules y en rosado si son coincidentes a la dirección dela lámina.

- CALCULOS DE COMBINACION:

=====

Se caracterizan por poseer tanto macroscópicamente como al corte microscópico una estructura sumamente regular, alternando las capas del colesterol con las del pigmento teniendo un similar espesor cada una y una concontinuidad casi perfecta tal como se visualiza en la FIGURA N° 85 .

Pueden también detectarse acúmulos de materia amorfa que aparece con color negro y cristales de carbonato cálcico cuando se practica la visión a más aumentos. (FIGURA N° 86 )

La aplicación de nicoles cruzados evidencia los colores azules de interferencia de los cristales de colesterol y cuando aparece carbonato cálcico toman coloraciones rosadas. (FIGURA N° 87 )

- CALCULOS PIGMENTARIOS:

=====

Este tipo de cálculos no poseen una estructura determinada. Se ordenan de modo elemental dada su contextura amorfa, consistiendo en unión de acúmulos de pigmento entre sí. En la sección se muestran como conglomerados uniformes de color negro sin estructuración. (FIGURAS N° 88 A y B)

El centro del cálculo es más oscuro, siendo la periferia más clara. En ocasiones pueden formarse anillos concéntricos de material negro que se denominan MICROESFEROLITOS con un alto contenido en carbonatos, pero no se han observado en la serie presentada.

Con el microscopio, la observación del cálculo pigmentario con la técnica de la lámina delgada presenta una coloración marrón oscura con oscilaciones del tono pero sin conformación estructural alguna. (FIGURA N° 89 )

Al ser estructuras muy hidratadas, el proceso de desecado al que se

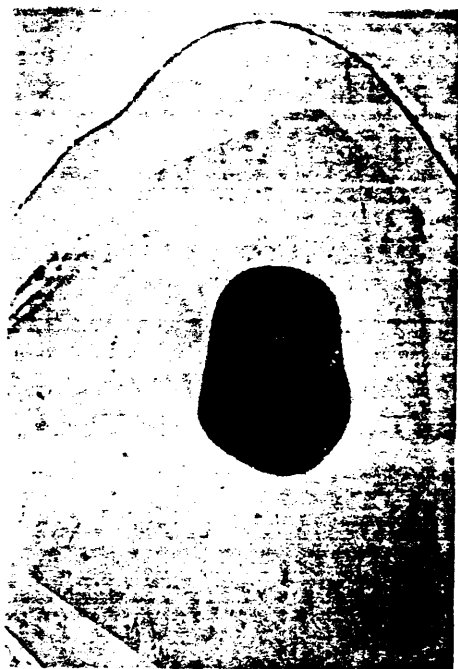


FIGURA Nº 85 .- Cálculo mixto de combinación al corte. (Técnica de lámina delgada.)  
Se puede observar la estructuración en capas de un modo regular con una alternancia casi perfecta de las de colesterol y pigmento.

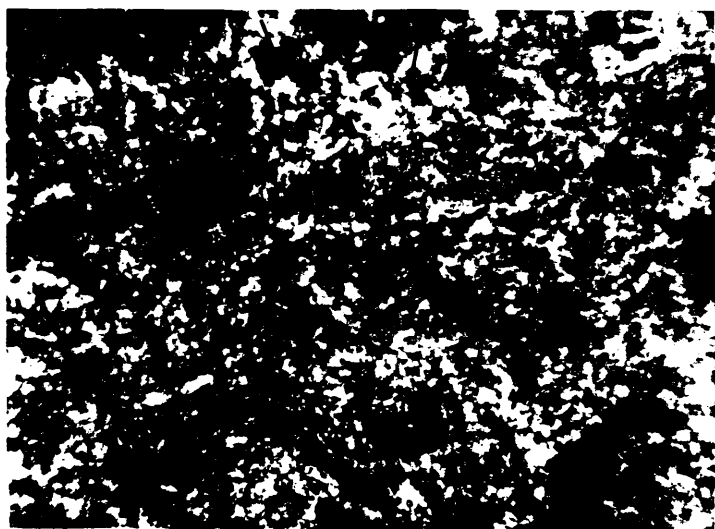


FIGURA Nº 86 .- Cálculo de combinación. (160 x)  
Regularidad secuencial de las bandas de coles-  
terol y pigmento típica. También se ven acú-  
mulos puntuales de carbonato. (Flechas)



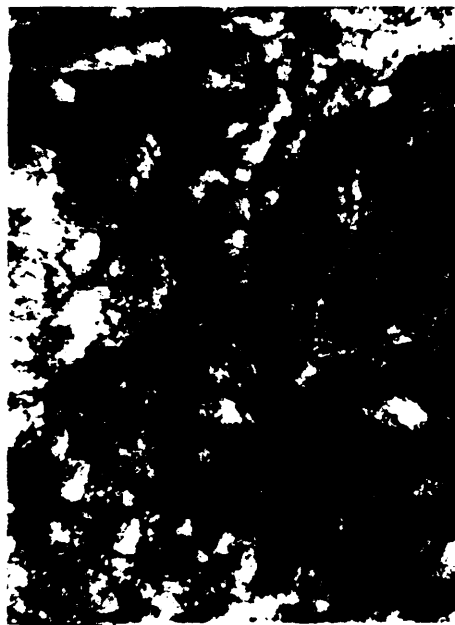


FIGURA Nº 87 .- Cálculo de combinación. (400 x. Nícoles cruzados.)  
El colesterol con su color azulado junto al pigmento, materia amorfa en acúmulos puntuales negros (Círculo) y carbonatos. (Flechas)



**FIGURA Nº 88 .-** Cálculos pigmentarios al corte. (Lámina delgada)  
 A) Pigmentario morular. Se ve su interior de co  
 lor negro y sin estructuración. B) Pigmentario  
 de forma abollonada como acúmulo de pigmento.

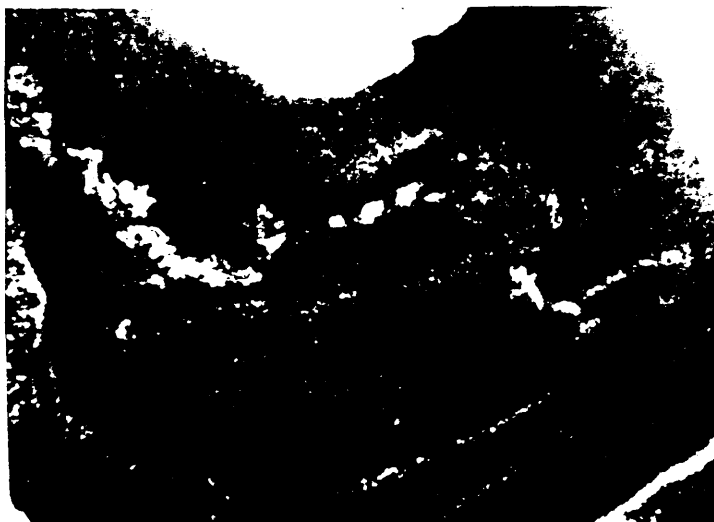


FIGURA N° 89.- Cálculo pigmentario. (160 x)  
Se reconocen franjas de mayor y menor concentración de pigmento con diferente tono.  
Aparecen puntos de carbonato. (Flechas)

somenten como trámite para el estudio provoca la aparición de unas grietas denominadas de DETRACCION, producidas por la contracción del resto de la sustancia. Este hecho crea un artefacto en la preparación por el que se transparenta el cristal sobre el que se coloca el corte del cálculo, como puede observarse en la FIGURA Nº 90 .

En casi todos los cálculos además de en los pigmentarios, se puede observar en mayor o menor cantidad un tipo de material que aparece en coloración casi negra también, en forma de acúmulos y que corresponde a una estructura proteica que no se ha llegado a identificar químicamente con estos métodos pues serían precisas técnicas de microanálisis.

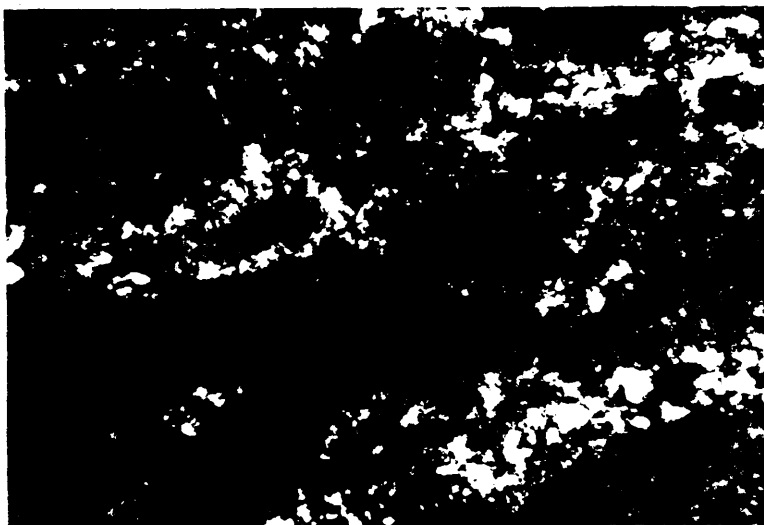


FIGURA Nº 90..- Cálculo pigmentario. (400 x)  
Zonación por el espesor. Se observan grietas de  
detracción por la pérdida de agua, que hacen  
trasparentar el cristal del porta.

### III.- RELACION ENTRE ESTUDIOS DE VESICULA BILIAR Y CALCULOS.-

Uno de los puntos más importantes de este trabajo era el intento de establecer relaciones entre los hallazgos obtenidos del estudio histológico de la mucosa de la VB, de su contenido en MP, de los datos sobre la composición de los cálculos y de los factores generales de los pacientes que portaban la litiasis en su VB.

Por ello se han relacionado los siguientes factores:

#### 1.- EDAD Y COMPOSICION DE LOS CALCULOS.-

Se ha relacionado la edad con la composición de bilirrubinato cálcico de los cálculos pigmentarios, observándose un rango de edad de 35-75 años, con una  $\bar{x}$  = 58.77 y desviación estándar de 11.96. Entre ambos factores no se encontró ninguna correlación estadísticamente significativa.

Los mismos factores se han valorado en los cálculos de combinación y en los mixtos. La edad en ello tuvo un rango de 26-87 años con media de 54.56 años y desviación de 14.35. El pigmento osciló entre 18-72,  $\bar{x}$  = 39.64 y la desviación fue de 13.30. Tampoco existió significación estadística en este caso.

#### 2.- BILIRRUBINATO CALCICO-CARBONATO CALCICO EN CIRROTICOS.-

Cuando se establecen correlaciones entre los dos componentes de los cálculos como son el bilirrubinato y carbonato cálcicos en los casos de pacientes con cirrosis hepática, que fueron 21 en total, se observa una significación de  $p < 0.015$  con  $r = -0.5372$ .

El rango del  $\text{CO}_3\text{Ca}$  fue de 0-5 con  $\bar{x}$  = 0.60 y desviación de 1.27. El rango del bilirrubinato fue de 27-84 con  $\bar{x}$  = 44.45 y desviación de 14.43.

La fórmula que mejor se ha adaptado a tal relación ha sido la lineal

con una fórmula de  $y = -1.506 + 0.047 x$ . Otras correlaciones como la logarítmica o la polinómica son menos representativas. (FIGURA Nº 91)

### 3.- CALCULOS PIGMENTARIOS - SEXO.-

De los 9 cálculos pigmentarios que se obtuvieron en la serie, en 8 casos, lo que representa un 88.8% fueron en mujeres y sólo 1 en varones. La edad de incidencia fue similar en ambos y el rango también fue igual.

### 4.- CAMBIOS HISTOLOGICOS - CALCULOS.-

Se han planteado relaciones entre los factores indicativos de los distintos cambios histológicos de las VB y la composición cristalográfica de los mismos. Los datos estadísticos se encuentran en parte en la TABLA VII.

En concreto, la relación entre CH y los cristales de colesterol o el bilirrubinato cálcico de los cálculos no ha tenido significación estadística.

### 5.- CAMBIOS HISTOLOGICOS - MUCOPROTEINAS.

Estableciendo relaciones estadísticas entre CH y los diferentes parámetros por los que se ha valorado la existencia y tipificación de las MP se han visto que en ningún caso existe significación estadística.

No lo fueron las relaciones CH con suma ER; suma GL y total de mucinas, así como CH con los 3 tipos de MP : MN, MAMS y MAPS.



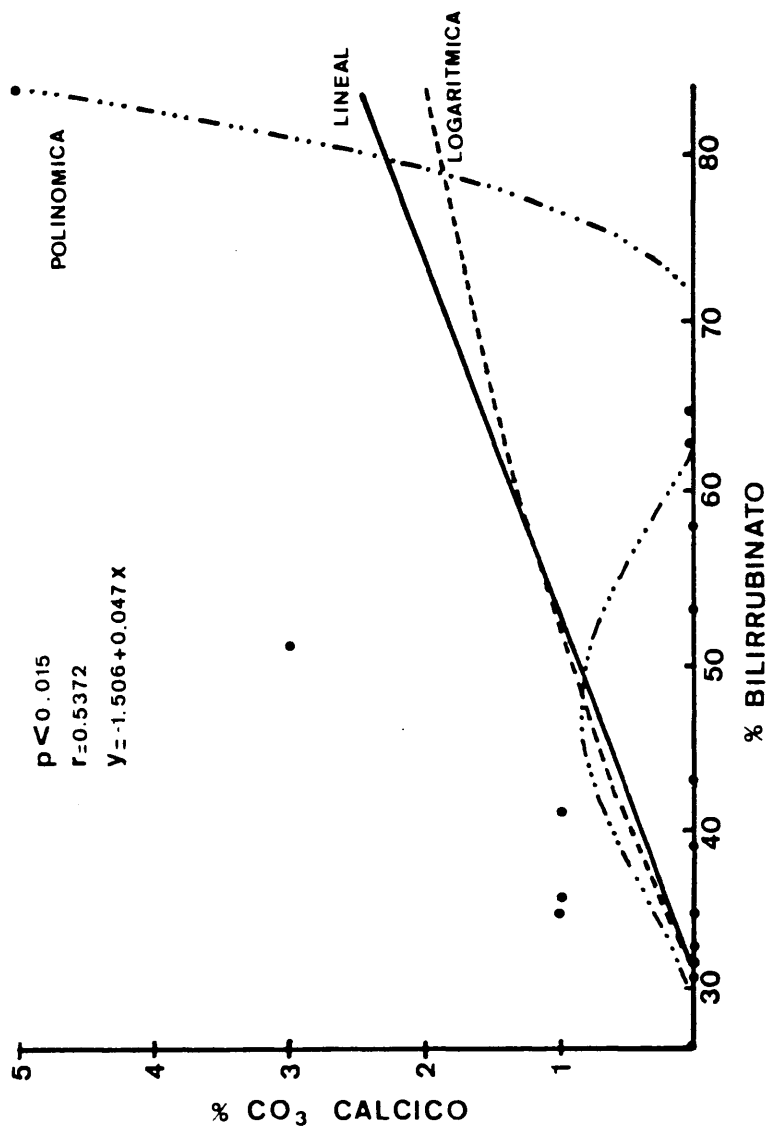


FIGURA Nº 91.- Representación de la relación entre contenido bilirrubitato y carbonato cálcico en los 21 pacientes con cirrosis hepática.

6.- CÁLCULOS - MUCOPROTEÍNAS.-

Tampoco se han hallado correlaciones significativas entre los porcentajes de colesterol o de bilirrubinato cálcico de los cálculos con respecto a la suma de ER, suma GL y total de mucinas.

Entre los tipos de mucinas y los componentes de los cálculos los resultados han sido de no significativos cuando se relacionado MN Y MAPS con colesterol y bilirrubinato.

Las MAMS con el colesterol y bilirrubinato han tenido una  $p < 0.05$  pero sin tener correlaciones claras en fórmulas por lo que no se ha tomado como una relación consistente.

## DISCUSSION.

El avance de las técnicas histoquímicas y cristalográficas ha facilitado tanto el análisis de los tejidos orgánicos y de sus componentes y el estudio exhaustivo de los minerales y por extrapolación de los cálculos biliares al considerarlos como éstos.

Gracias a estas técnicas se han podido valorar tanto la existencia y tipificación de las MP en diferentes tejidos así como la composición cristalográfica de los cálculos. Sin embargo en la VB humana no se han realizado estudios en profundidad por lo que a la hora de comparar datos de la literatura con los obtenidos en el presente trabajo se plantean dificultades.

Del mismo modo, el intento de relacionar los hallazgos histológicos y del estudio de MP en las VB con litiasis, con los hallados en el análisis de sus cálculos correspondientes, ha supuesto una novedad, al no encontrarse antecedentes similares en las publicaciones revisadas.

Por todo lo anterior se considera la discusión interesante en cuanto a las nuevas aportaciones que de aquí puedan extraerse, aunque sea complicado en muchos de los casos contrastar los resultados con los de otros autores.

Se ha dividido en dos partes la discusión dado que ambas precisan comentarios. Son las siguientes:

I. DISCUSION DE LOS METODOS.-

II. DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

## I.- DISCUSION DE LOS METODOS.-

En los 100 pacientes que han constituido la muestra, la edad media obtenida ha coincidido con la que se reconoce para la patología litiásica de la VB, situándose en los 54.3 años, aunque algunos autores la consideran más frecuente en la década de los 60 a 70 años. (20,161) dado que se reconoce el aumento de la incidencia con el avance de la edad.

No se ha podido tener en cuenta el factor racial dado que todos los casos eran de raza blanca.

Respecto al sexo, la incidencia ha resultado mayoritaria en las mujeres en el 77% con una relación mujer/hombre de 3:1 que corresponde también a la obtenida por la mayoría de los estudios mundiales. (93) Los cálculos de pigmento en concreto se producen más en mujeres, apareciendo en el 88.8% sin que se hayan encontrado explicaciones a este hecho.

Los cálculos de colesterol han aparecido en una edad más alta que la media, oscilando entre los 50-72 años y con una media de 60.5. Si tomamos en cuenta al varón con cálculos de colesterol, su aparición en ellos ha sido en edades más tardías que en las mujeres, hecho refrendado por autores como La MORTE (93) y GRUNDY (270).

La multiparidad como factor predisponente al padecimiento de la litiasis es un hecho descrito, pero que en nuestra serie no ha obtenido una significación estadística evidente. (350)

Otros factores como la toma de anovulatorios o el tipo de dieta, considerados importantes a la hora de alterar la composición de la bilis (190, 281, 351) no se han analizado. Sin embargo, sí ha tenido especial importancia la valoración de las enfermedades asociadas a la litiasis, por la probable relación con ella. En el 63% de los pacientes existía otro padecimiento y en algunas ocasiones más de uno. La combinación de litiasis y otras diferentes enfermedades tanto benignas como malignas ha sido bien expuesta en la bibliografía. (164,186,222,227,232,236,237,240,241,242)

La anemia hemolítica, tan ligada a la aparición de litiasis tipo pig-

mentario sólo se ha encontrado en 2 de los 9 casos con este tipo de cálculos. (198) Corresponde al 22.2%, lo cual es una alta incidencia, pero dado lo escaso del número de casos no pueden obtenerse conclusiones.

En el 23% se asocian a coledocolitiasis, lo que demuestra la existencia de factores favorecedores de la litiasis en la bilis y que también están presentes en la vía biliar además de la VB, (161, 217) además de los factores propios de la misma vía biliar, y de la migración a través de la VB.

La relación de la litiasis con la cirrosis hepática es conocida (346,352). En 21 pacientes se han encontrado juntas, cifra similar a la del 20-27% dado en la literatura, (232, 352) aunque otros autores sólo lo encuentran en el 4%. (233) No se ha visto sin embargo que tuviesen preferencia por ningún tipo de cálculo en concreto.

Otras aportaciones sobre la patología asociada a la litiasis no se han encontrado relevantes, no planteándose en la discusión por la falta de datos. Únicamente constatar que en 2 ocasiones (2%) se evidenció además de la litiasis un adenocarcinoma de VB coexistente con los cálculos. Corresponde al 1-2% descrito en la literatura (240,353), como esperable en las VB con litiasis y que pueden pasar desapercibidas hasta el momento del análisis histológico de la pieza extirpada. Esto ocurrió en nuestros casos.

La concurrencia con otro tipo de neoplasias no se ha estudiado de modo objetivo ni estadístico por lo que no se pueden comentar con respecto a otros autores.

Por fin, se considera que el número de muestras elegido, unas 100, es suficientemente representativo a nivel estadístico como para que se puedan tener en cuenta las conclusiones y resultados que de los diversos estudios se deriven y sirvan de consideraciones sobre la patología de la litiasis vesicular en nuestro medio.

#### 1.- ESTUDIO DE LA VB.- =====

En general se está de acuerdo en que para la detección de cambios histológicos e inflamatorios, la técnica de elección es la HE. Es la más fiable fácil y útil con su estudio al microscopio óptico. (354)

En el presente trabajo y para la valoración de las modificaciones histológicas de la mucosa de la VB con litiasis, se ha tenido en cuenta que algunos de los factores considerados por NAHRWOLD (48) como base de los cambios histológicos y que traducen la colecistitis crónica que \*se encuentra en la VB calculosa. Se han excluido otros como el engrosamiento de la capa muscular por no considerarlo relevante. Sin embargo se han incluido la atrofia, la metaplasia y la inclusión de microcálculos, dado que son aspectos muy fiables de las variaciones que sufre la VB en la litiasis. (19,24)

LAITIO (19) y posteriormente otros autores (292) introdujeron las diversas modificaciones de la técnica de AA para determinar la existencia de MP en la VB. Se acepta que los AA a diferentes pH y el ALDA-FUC (287,355) son métodos sencillos de realizar histológicamente y bastante fieles en cuanto a la valoración de los tipos de MP en ácidas sulfatadas o no sulfatadas. (19,45, 292) Junto a la utilización del PAS que identifica las MN como PAS positivas, se consigue detectar todo el abanico de grandes tipos de MP contenidas en las células. (37,49, 351)

Se pueden utilizar como han hecho diversos autores (49,256) una amplia variedad de técnicas como el PAS diastasa, Hierro coloidal, PAS con hierro coloidal, Hierro diamina, PAS con AA y AA a pH= 2.7, etc. No se han practicado en nuestro estudio por considerar que son unas técnicas más complejas que las utilizadas, y que por el contrario no aportan muchos más datos de los que se han podido obtener con las 4 técnicas mostradas, respecto a la identificación de sustancias de origen mucoproteico y la posibilidad de tipificarlas.



La realización de varios métodos de tinción histoquímica para la determinación del tipo histoquímico de MP en la VB se introdujo en 1972 por LAITIO y cols. no habiéndose utilizado de modo seriado con este fin y en humanos por ningún autor dentro de la bibliografía revisada.

Con el sistema de búsqueda de MP propuesta por COOK (287) de manera general, se consigue realizando los 4 métodos practicados, la determinación de los 3 tipos más importantes de MP, además de la cantidad existente de cada una en cada muestra de VB analizada.

La medición de la cantidad no se hace con el método utilizado por nosotros de manera exacta pero sí aproximativa. Se basa en la intensidad de la tinción según la mayor o menor cantidad de material de MP que contenga. Indudablemente este sistema de valoración tiene como inconveniente el estar supeditado al ojo humano y no poderse calibrar con un aparato con más exactitud a la hora de medir. Este error sin embargo se ha tratado de minimizar al máximo haciendo que sea una sola persona la que valore todos los métodos y todas las muestras de VB, objetivando los resultados todo lo posible mediante la aplicación de un sistema de numeración.

Quizá fuera posible por la realización de otras técnicas asociadas más complejas identificar casi exactamente el tipo de MP y no sólo el grupo al que pertenecen, pero ello comportaría una excesiva complejidad, con la obligación de practicar técnicas engorrosas y que realmente no se considera que se aporte ningún dato significativo añadible al estudio planteado en nuestros términos, dado el estado actual de los conocimientos en la materia. Quizá tras la obtención de conclusiones, interese profundizar en este aspecto del tema en un futuro trabajo.

## 2.- ESTUDIO DE LOS CALCULOS.-

Los cálculos de la VB pueden considerarse en abstracto como conglome-

rados de cristales además de otras sustancias, por lo que se han analizado con métodos cristalográficos aplicados a los minerales en general.

La clasificación mediante la valoración de aspectos macroscópicos ha resultado fiable en el 100% de los casos, cuando se realiza de un modo concienzudo puesto que sus datos se han correlacionado en todos los casos con los estudios microscópicos. Se considera útil por ello junto a autores como TROTMAN (158) aceptándose de modo generalizado. (161)

El análisis de las características físicas como la fragilidad, dureza, color y estructuración interna, brillo, laminación, etc. se ha practicado por el sistema de la fragmentación que viene siendo el utilizado por el grupo de RUIZ DE AGUIAR y cols. (248, 250,255,256) con muy buenos resultados.

Otros métodos aplicados para el estudio de los cálculos son similares a los utilizados para los minerales como es el de cristalografía de lámina delgada, dado que pueden considerarse como tales. Este método ha sido utilizado para la valoración morfológica casi siempre (262, 248) pero la faceta cuantificadora de los diferentes tipos de cristales y sustancias que los componen, con la intención de conocer la composición lo más exacta posible del cálculo, no se ha visto en la literatura. Sólo se ha utilizado por RUIZ DE AGUIAR y cols.(255) para determinar la presencia del palmitato de calcio en cálculos con colesterol.

La composición del cálculo ha sido analizada por SUTOR y WOOLEY de un modo riguroso (254,258,270) mediante la difracción o cristalografía de rayos X consiguiendo la cantidad exacta de sus componentes y detectando hasta 11 minerales diferentes.

Estos métodos son sin embargo complejos y precisan de un laboratorio de análisis químico y de un profundo conocimiento en la materia para saber interpretar los resultados.

El método de la lámina delgada, sin embargo, es más sencillo de aplicar y aunque requiere también de un microtomo y microscopio especiales, la

observación y análisis de cada muestra es más simple.

No son métodos de contaje exacto dado que dependen del observador que lo realiza mediante la técnica del cálculo de áreas, pero el error no deja de ser considerado mínimo en manos expertas. Por eso se ha admitido como válido para la determinación de la composición de un cálculo, aunque con el límite de que sólo se consigue discernir entre los 3 componentes principales (colesterol, bilirrubinato de calcio y carbonato cálcico) además de una sustancia que se denomina residual que engloba a diversos materiales amorfos. No es un método pues, tan discriminativo de los elementos como el utilizado por SUTOR y cols. pero se ha mostrado suficientemente útil a la hora de poder catalogar los cálculos y su tipo. Tampoco se puede determinar la composición a nivel centesimal pero ello no es motivo expreso del presente trabajo.

Este método de la lámina delgada tiene además la ventaja de que al mismo tiempo puede analizarse la morfología del cálculo, además de la conformación y colocación de sus cristales y componentes. Este aspecto sólo podría observarse mediante técnicas morfométricas pero que no nos darían la posibilidad de valorar la composición, como ocurre con la difracción de rayos X, microscopía de scanning, etc. (158,225,264,265)

La introducción de aditamentos como los nicoles cruzados o la lámina compensadora de rojo de 1º orden, se utilizan en cristalografía para determinar la conformación espacial de los cristales y por ello hemos visto útil su uso en los cálculos, junto a RUIZ DE AGUIAR (250,255). No se han publicado resultados de estos análisis en grandes series pero existen ya datos de la observación de los diferentes cálculos, sobretodo de los que contienen colesterol, lo que colabora al mejor conocimiento de la estructura interna de las concrecciones biliares.

## II.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS.-

#### 1.- ESTUDIO HISTOQUIMICO DE LA VESICULA BILIAR.-

Las alteraciones histológicas de la mucosa de la VB con cálculos se han considerado habituales por todos los autores que han estudiado esta patología (26,354) hasta tal punto que el término "COLECISTITIS CRONICA" ha sido aplicado para todas las VB con litiasis. (48) Sin embargo esta denominación implica una inflamación y por consiguiente el hallazgo histológico de una infiltración celular característica. En caso de cronicidad se observarán linfocitos y células plasmáticas y en caso de colecistitis aguda aparecerán neutrófilos.

En nuestras VB han existido datos más importantes que la infiltración. Así la atrofia de las vellosidades y de la mucosa, así como la fibrosis, han sido más frecuentes e importantes y por ello los consideramos más específicos de las alteraciones de la VB con cálculos, que la inflamación. Consideramos que el término de colecistitis crónica se debe desterrar, como unido al de la colelitiasis, por estos motivos.

La atrofia ha sido una de las modificaciones más importantes tal como opina LAITIO (19). Ha afectado en mayor grado a las vellosidades (69%) que al epitelio (31%) aunque la intensidad en ellas fue de  $x=2.3$  menor que en el epitelio con  $x= 2.9$ . Puede ser una consecuencia de la inflamación. (19)

La metaplasia de tipo antral gástrico o intestinal se encuentra hasta en el 50% según la opinión de algunos autores (24,86,192), como consecuencia de la inflamación en grado terminal e incluso considerándose como una degeneración. Las estadísticas de la literatura coinciden con nuestros hallazgos pues hemos observado esta metaplasia en el 50.5% siempre del tipo antral.

Como consecuencia de los cambios inflamatorios se produce infiltración de células. Fundamentalmente han sido los linfocitos (77%) seguidos de las células plasmáticas en cuanto a frecuencia (33.7%), mostrando una característica de cronicidad e inespecificidad en ellos. Esta infiltración afecta a la submucosa en la mayoría de los casos (59% y 30%), seguido del resto de capas pero sólo en 1.1% se da en la mucosa.

En otras ocasiones las células encontradas eran representativas de inflamación de tipo agudo: neutrófilos, eosinófilos y otras. (5.6% y 16.8%)

La fibrosis se ha achacado a pequeñas ulceraciones que se producen en la mucosa y que dejan una cicatriz fibrosa que conduce a la fibrosis como estadio terminal. (30) Se ha encontrado en nuestros casos generalmente en la capa muscular, lámina propia y donde existe tejido conectivo según MAKI (229), que es la serosa. En ésta estuvo presente en el 60.6% con mayor intensidad de  $x=1.9$ , frente a la submucosa y muscular con afectación de 44.9% y 32.5% de las VB y una  $x=1.6$  y  $1.7$  respectivamente.

La presencia de colesterosis o macrófagos con contenido de colesterol ha sido visto en el 15.7%, cifra menor que la encontrada en estudios como los de LAITIO (19) y KING (24), que lo observan en el 40% de las VB. El hallazgo de cristales incluidos, se ha considerado junto a otros autores (29) como estadio precoz en la formación de cálculos. Se han visto en el 3.3%.

La VB considerando todos estos parámetros, sufre una modificación histológica siempre, puesto que se ha observado en el 100% de las muestras analizadas. En el 90% ha sido de grado leve-moderado y nunca de grado severo. Esto indica que nunca tendría cálculos una VB normal (70) pero existen opiniones en contra como la de DIAMOND (65). Este autor considera que sí pueden producirse cálculos a pesar de que la VB sea normal y su concentración también, por poseer una bilis de carácter patológico. Sin embargo y dados los resultados obtenidos en nuestro estudio pensamos que la VB tiene un papel más activo en la litogénesis que el del mero portador de los cálculos, dado que en todos los casos se han producido lesiones histológicas en su mucosa y también se ha encontrado contenido de MP, que son consideradas base de la nucleación cuando se eliminan a la bilis.

Tomando como evidencia de la presencia de MP en gránulos en la célula, la reacción positiva a las diferentes tinciones realizadas, podemos afirmar junto a LEE (53) y ELFING (43), que se produce un incremento en la producción de moco en las VB con cálculos, tal como hemos visto.

La demostración de que predomina uno u otro tipo de MP en ellas es difícil de realizar y existen opiniones encontradas al respecto. (356) Mientras que LEE y cols. (296) afirman que no hay cambios cualitativos en el moco de una VB patológica respecto a una normal, otros autores sugieren por los estudios practicados en VB con cálculos pertenecientes a animales, que la MP predominante es del grupo de las débilmente ácidas poco sulfatadas. (43)

Esta idea se ve apoyada por la tesis de que las células normales producen MP más ácidas y serían reemplazadas por las MP poco ácidas de origen glandular en las condiciones patológicas de litiasis. (25)

Se han visto también que los gránulos de las VB más inflamadas son más numerosos, densos y teñibles con el método del PAS, que el resto, lo que indica el carácter de MP de tipo neutro y no ácida que contiene. (2,15) En nuestra serie se ha ratificado este hecho. En el 100% de las VB existen MN y MAPS mientras que sólo en el 46% se encontró además MAMS junto a las anteriores. LAITIO (19) ha mostrado más cantidad de MAMS en el epitelio y glándulas y del tipo neutro o MAPS en áreas con metaplasia o células caliciformes. Nosotros podemos afirmar el primer hecho, dado que en el ER y glándulas la MAMS es más abundante que en el resto de zonas, pero la segunda no la hemos comprobado al no haber detenido la atención en el estudio de áreas de metaplasia aparecidos en las VB, aunque en los casos observados sí aparece una mayor intensidad tintorial para el PAS y el AA a pH= 2.5, si bien no se pueden emitir datos objetivos al respecto.

La cantidad producida de MP se ha podido evidenciar que es mayor en las GL ( $x=4.77$ ) que en el ER ( $x=3.77$ ) corroborando lo observado por otros autores (87) dado que la glándula es la productora principal de las sustancias mucosas. En los SRA la cantidad de MP fue  $x=3.48$  de media, menor que en las otras dos áreas, lo que no está de acuerdo con lo dicho por WOMACK (87). Este autor encontraba en los SRA más cantidad de MP que en el resto. Nosotros no hemos obtenido estos datos en cuanto a media de MP. La diferencia puede radicar en que WOMACK ha analizado un número concreto y pequeño de VB y que nosotros hemos obtenido la cifra media. Contando con

los casos en los que no se ha encontrado SRA, todo ello, puede explicar la diferencia. Los SL son los que menos MP contienen.

Existe una gran variedad de MP dentro de una misma célula e incluso dentro de un mismo gránulo. No se ha encontrado ninguna célula o VB en la que sólo se encontrase un tipo de MP, puesto que siempre en otras zonas se ha encontrado otro. Cuando una célula contiene varios tipos de MP en la zona del polo apical o mundial, hay menos de MP tipo ácido (294) y más gránulos positivos para PAS y AA pH=2.5, es decir con contenido de MN, indicando un cambio irreversible según LEE y cols. (49)

Si se practica la tinción en VB tras la administración de lincomicina, en animales de experimentación (36) se puede ver que se tiñen más por el PAS y AA pH= 2.5 indicando su origen de MN. Por el ALDA-FUC que detecta MAPS se tiñen menos y sobretodo lo hacen en el borde del epitelio y en los gránulos apicales. Se considera que la VB de animales y la de humanos, tanto en aspectos de morfología como funcionales, tienen una gran similitud (7,8) y por tanto los resultados se pueden extrapolar al humano teniendo en cuenta las escasas características peculiares.

En general, con las técnicas del PAS, AA pH=2.5 y ALDA-FUC se produce un patrón tintorial que afecta a la pared vesicular desde un punto de vista arquitectural, de un modo difuso en las 4 zonas analizadas. Este hecho traduce que las MN o MAPS están de manera difusa siendo más abundantes en las GL que en el ER en el caso de las neutras y en el de las MAPS el lugar de predominio son los SRA, seguidos de ER y GL. Su intensidad de tinción ha sido moderada en la mayoría, indicando que la VB produce MN y MAPS en el 100% de los casos, pero en moderada cantidad.

En el caso de la técnica del AA pH=0.5, la distribución tintorial vista arquitecturalmente es del tipo focal. Se evidencia en las 4 zonas y es más intensa en las GL. Con ello se demuestra que las MAMS se producen en ciertas células, que dan la imagen de focalidad microscópica, mientras que las MN y MAMS se fabrican de modo generalizado en todas las células. La



razón no ha podido ser descubierta, aunque puede pensarse que si las MAMS son las que corresponden a la producción de una VB normal (25) la alteración que conlleva su disminución va afectando de manera gradual y paulatina a grupos de células, es decir, focalmente, dejando islotes de células normales.

Cuando se examina la célula, se evidencia que en el polo apical es donde se produce el mayor número de cambios histológicos y es donde aparecen los gránulos con contenido mucoproteico (41,49), siendo este hecho un indicador de la lesión que se produce en la VB cuando existe litiasis. (46) Estos gránulos son una evidencia importante ya encontrada por muchos autores que han estudiado esta patología (15,17,19,22,49,55) y que en el tiempo, preceden a la aparición de concrecciones calculosas. (56)

Se ha especulado sobre si estos gránulos representan vesículas pinocitóticas, pero la verdad es que nunca se han podido visualizar en el momento de la excrección al exterior. (2,15,25) Sin embargo se han erigido en uno de los puntos principales de la idea que imprime a la VB un carácter activo en la litogénesis, puesto que estos gránulos serían la base sobre la que las sustancias y componentes de la bilis se irían aponiendo. Formarían el núcleo del cálculo, y de ello que sea una evidencia importante el encontrar que el material central del núcleo es una sustancia amorfa compatible con las MP. (55,86,87,296,315,326)

En nuestro trabajo, se confirma que en el 99% de las VB y en todas las técnicas histoquímicas utilizadas, la tinción se produce en gránulos localizados en el polo mundial. Sólo en el 1% la tinción es difusa en toda la célula. El centrar nuestro estudio en el polo apical, y no enfocar nuestra atención en el basal, se ha debido a este motivo, puesto que los cambios histológicos y los gránulos han aparecido en el primero y nunca o en escasísima cantidad en el segundo.

La MP por tanto se encuentra en el 99% de los casos, englobada en forma de gránulos redondeados y localizados en el polo apical de la célula, si-

ilarmente a lo expuesto por FOX y cols (8) y HAYWARD y cols (25), tanto en humanos con microscopía electrónica y en VB de animales. (15,56)

La intensidad de la tinción ha sido el indicador de la cantidad de MP que contenía cada célula. La mayoría han sido de grado leve o moderado siendo severa en menos casos (1-12.6% con el PAS; 3.5-19% con AA pH=2.5; 1-13.6% en AA pH=0.5 y 3.2-29% con el ALDA-FUC). Dentro de la literatura se afirma que la cantidad de moco en estas VB es mayor que en las normales pero en base a la intensidad tincional sólo se ha visto que se plantea la valoración de la cantidad por FRESTON y cols.(86) y otros (294,296,303). Además el primero cuantifica este proceso por la valoración de la secreción de hexosamina a la bilis, y siempre en animales.(86) En ningún caso se llega a conclusiones determinantes, salvo en que parece encontrarse una producción intensa de estas MP. (15,43,53,55,56,79)

El análisis de las células que se tiñen por entero y no sólo en el polo mundial, da que su porcentaje oscila mucho según la técnica utilizada. Mientras que constituye sólo el 1% en el caso de AA pH=0.5, alcanza el 27%, 41.6% y 16% en el PAS, AA pH=2.5 y ALDA-FUC. Se puede sacar en consecuencia que las MN y MAPS se distribuyen en un alto grado de manera difusa y van siempre juntas comportándose de la misma manera, puesto que además de los gránulos se encuentran en muchas células de modo difuso y con más frecuencia afectando a las GL. Las MAMS sin embargo, se localizan en gránulos, menos en el 1% difusamente en toda la célula.

Ha sido curioso determinar que el 87-100% de las células que se tiñen enteras lo hacen con una intensidad grado 3 o muy alta. Podría demostrar con ello, que cuando la célula se replecciona totalmente de MP está tan afectada por los mecanismos etiopatogénicos que aún no conocemos, que constituye una evidente manifestación del alto nivel patológico de esa VB.

La determinación cuantitativa de las MP en el ER y en las GL ha mostrado que existe entre ellos una correlación estadística basada en que

si el epitelio se altera más o menos, las células de las GL también sufren esta modificación siguiendo una relación basada en una recta. Es lógico, pues la GL es la que padece con más intensidad las irritaciones y ataques inflamatorios, respondiendo con la mayor producción de MP. (24,69,79)

Del mismo modo, existe una correlación entre las cantidades de MP de ER y GI respecto al total, debido a que los dos primeros son parte del segundo, elevándolo cuando ellos se incrementan. La cantidad media total de MP ha sido determinada como 11.69 cuando el máximo alcanzado ha sido de 24 y el teórico de 36. Ha habido pues un incremento respecto a las normales pero sin alcanzar el tope establecido en ningún caso, y no llegando a cantidades muy altas salvo en excepciones.

Los 3 tipos de MP también poseen algunas relaciones. Entre las cifras de MN de cada una de las VB y las de MAMS existe correlación estadística pero no buena, aunque se ha podido determinar la función que podría ser representativa. Lo mismo ocurre entre MN y MAPS. Cuando comparamos MAPS y MAMS sí obtenemos una significación estadística en la correlación con una función que sí es representativa. Estos hallazgos traducirían una dependencia entre los tipos de mucinas ácidas entre sí, de manera que cuando uno aumenta el otro también lo hace. Quizá la explicación sería la utilizada para otros hechos. Cuando la VB se altera y sufre unas modificaciones histológicas, se incrementa la producción de gránulos MP por sus células, siendo hipersecretadas tanto las MAMS como las MAPS. Sin embargo este hecho no se corresponde con lo anteriormente expuesto de que las MAMS son producidas en las VB normales y van siendo sustituidas por las MAPS de las VB patológicas, según la opinión de HAYWARD y cols. (25)

Si la comparación de datos la practicamos entre los que traducen los cambios histológicos y el total de MP, MN, MAMS y MAPS, no se obtienen en ninguno de los casos ningún nexo de unión entre ellos. Tampoco se encontró entre los cambios histológicos y las MP de ER y GL. Implica que dichas modificaciones que padece histológicamente la VB no se correlacionan con

ninguno de los datos analizados en relación con las MP.

En consecuencia, puede afirmarse que las modificaciones que sufre la VB a nivel de su mucosa, debidas a la existencia de cálculos, son inespecíficas puesto que se acompañan de un incremento en la producción de MP pero sin que conlleve una dependencia respecto a elevar la producción de un tipo u otro de MP o en un lugar u otro de la mucosa. Son cambios derivados de la litiasis sin que existan factores que los condicionen.

## 2.- ESTUDIO CRISTALOGRAFICO DE LOS CALCULOS.-

Los cálculos producidos en la VB han sido desde hace gran cantidad de años motivo de estudio. Se han ido introduciendo métodos gracias a los que el conocimiento de su mecanismo de formación ha progresado enormemente.

Su estudio ha pasado desde la descripción de las características externas macroscópicas, al más sofisticado análisis por espectrofotometría. (265) La clasificación de los tipos de cálculos ha sido difícil dada la gran variedad que existe, pero se ha aceptado la emitida por BOCKUS en 1976 y modificada de anteriores como la más general y sencilla. (256)

El examen macroscópico de las cualidades y propiedades físicas de los cálculos como color, brillo, porosidad, fragilidad, resistencia, elasticidad, etc. ha servido para que autores como RAINS (181) y otros (161,172,282) como ISPIZUA en España (283) hayan emitido diferentes formas de clasificarlos en base a aspectos diferentes. Por todos estos estudios pueden dividirse en tres grandes grupos además de otro que engloba a cálculos más raros. Siguiendo a estos autores y en base a la clasificación de BOCKUS hemos encontrado 85 cálculos (85%) del tipo mixto contando con 3 (3%) del tipo mixto de combinación; 9 (9%) pigmentarios y 6 (6%) de colesterol puro. No se han visto cálculos de los denominados raros, como de triglicéridos o carbonato cálcico (108), a pesar de que KAMEDA (298) encuentra el 1.6% de este tipo de cálculos.

Se considera que esta manera de examinar los cálculos es bastante exacta si se realiza de modo serio y objetivo, según opina TROTMAN y cols. (158), corroborándose los datos con métodos químicos o microscópicos de modo semejante a los ocurrido en nuestra serie.

El método de la fragmentación de los cálculos, consideramos que es complementario del macroscópico para poder realizar una determinación exhaustiva de las cualidades del cálculo. Las claras diferencias tras la rotura del cálculo entre un tipo y otros, hace emitir teorías sobre las diferentes

vías de formación de los cálculos. Creemos que el exámen morfológico no debe reducirse al de las características externas, sino que debe acompañarse de una profunda investigación del interior y del comportamiento que presenta el cálculo al ser cortado, fragmentado o machacado.

Igual que los autores estudiosos de este tema (161,172), hemos observado que el cálculo compuesto de colesterol posee unas características especiales gracias a la presencia de los cristales de colesterol. Ellos le proporcionan el color blanco o amarillo así como su brillo tanto en el interior como exterior (248). El cálculo pigmentario sin embargo es negro y se convierte en arenilla por la fragmentación, debido a su falta de conformación interna por lo que se deshace con facilidad. (161,172, 258,263,264)

El tamaño no ha constituido una característica determinante. El número de cálculos, por el contrario, es interesante, porque condiciona de manera conocida su propia conformación externa. Los casos de cálculos únicos encontrados en nuestra serie, que han sido 23 (23%) aparecen como moldes de la VB de gran tamaño y forma ovalada (288), mientras que si son muy abundantes en número han de colocarse muy unidos unos a otros, dejan huella en sus facetas la presencia del cálculo de al lado.

LINDSTROM (282) encuentra un 26.6% de cálculos únicos lo que se corresponde con el nivel del 23% de nuestra serie, aunque la pequeña superioridad de su cifra puede atribuirse a que su análisis fue hecho en autopsias, por lo que tiene en cuenta los hallazgos causales de litiasis que nosotros no englobamos.

Se han descrito en la literatura las posibles diferencias en cuanto a la clínica de cada tipo de cálculo según el tamaño ( 59), pero no se han evaluado estos aspectos en el presente trabajo por lo que no podemos considerarle.

Es notable que todos los cálculos únicos pertenecieran al tipo mixto, no siendo ninguno de colesterol o de pigmento puro. Este hallazgo podría explicarse por la existencia de un estímulo que produjera un cálculo formado

sólo o mayoritariamente por una sustancia, cuando fuera tan intenso como provocar un gran cálculo y si no lo es, daría pequeñas concrecciones. Esta idea no se ha considerado por otros autores. (59,282)

El hallazgo de una numerosa cantidad de cálculos en la VB ha sido de un 35% en el presente estudio, siempre teniendo en cuenta que sólo se valoran en más de 10 y nunca con el número exacto, dado que ello no se ha considerado importante para el motivo que nos ha ocupado. Otros autores encuentran sólo el 19.2% de más de 10 cálculos en las VB. (282)

El análisis del cálculo por métodos macroscópicos y de fragmentación nos ha llevado a clasificarlos. En todos los casos estos datos han sido corroborados posteriormente con los estudios de lámina delgada al microscopio óptico. Hemos utilizado la clasificación de BOCKUS (256) teniendo el porcentaje de colesterol de los cálculos como agente delimitante por lo que los cálculos de colesterol contienen más del 75% de cristales del mismo y han sido el 6%. Con menos del 15% de colesterol han sido 9 considerados como pigmentarios y entre ambas cifras se encontraron los 85 mixtos, dado que entre los de combinación y los que no lo son sólo existen diferencias morfológicas y no cuantitativas de composición.

Estos resultados son compatibles con los de la bibliografía mundial. En países occidentales tal como se expone en los estudios multicéntricos realizados en 9 países de SUTOR Y WOOLEY (254), de BELL (173) en Inglaterra y de APRAHAMIAN (275) en Francia, las estadísticas revelan que los cálculos compuestos de colesterol y mixtos son los más frecuentes. Este predominio oscila en porcentaje pero encontrándose entre 58% y 80%. A este hecho se han aludido, razonamientos basados en los diferentes tipos de alimentación que existen en países occidentales y considerados civilizados y en los orientales o no desarrollados; raza; higiene; infecciones; etc. (217,276,277) En las áreas orientales predominan sin embargo los cálculos de bilirrubinato cálcico ya que según MAKI (172) y otros autores (217,219,274) se encuentran factores etiológicos como la sobreinfección de la bilis, la infestación por parásitos, etc. que no se producen en zonas civilizadas. (281)

Se ha obtenido posteriormente la composición cristalográfica de los cálculos según el método de la lámina delgada bajo el recuento de áreas al microscopio, utilizado fundamentalmente en examen de minerales. (262) Ha sido utilizada en el estudio de los cálculos biliares en España por el grupo de RUIZ DE AGUIAR y cols. (248,250)

Analizando y comparando los datos obtenidos de la composición de los cálculos, han surgido relaciones entre los diferentes componentes. Así, en los 6 cálculos de colesterol puro, el porcentaje de cristales de colesterol tiene una relación con el contenido de bilirrubinato de significación estadística. ( $p > 0.01$ ) En los 85 cálculos mixtos y en el conjunto de los 100 cálculos de la muestra, ocurre lo mismo, de modo que esta relación se ciñe a una ecuación que representa la función con una  $p$  altamente significativa ( $p > 0.32 \times 10^{-52}$ ) Sin embargo ni en los 3 cálculos de combinación ni en los pigmentarios hubo esta correlación.

En los trabajos revisados de la literatura, existe la idea de que en el cálculo el contenido de colesterol y el de bilirrubina se encuentran en cantidades inversas. ES decir, ante la elevación de uno, existe menos cantidad del otro. (251,255,256) No se ha demostrado sin embargo en ningún estudio ni por ningún autor de manera taxativa por métodos de cuantificación y con análisis estadístico.

Podría existir un factor que regulase este equilibrio entre los dos componentes principales de los cálculos, pero esta idea sólo constituye una teoría.

Entre otros componentes existen también conexiones. En los 9 cálculos de bilirrubinato, la cantidad del mismo presenta una relación con la cantidad de sustancia residual, de manera que cuando uno se encuentra en mayor cantidad hace que se disminuya el otro, con una correlación estadística significativa. ( $p > 0.05$ ) Algunos autores (281,306) opinan que esta materia amorfa se deriva de restos sanguíneos debido a la hemólisis, que se considera un factor influyente en la formación de los cálculos pigmentarios. (222,223,224,226) Esta sustancia residual no se ha aislado en todos los cálculos, aunque sí en la mayoría, sin verse en un tipo u otro de cálculo en especial, no siendo significativa la relación entre este componente y los otros en los diferentes



tipos de cálculos.

El carbonato de calcio ha sido el tercer constituyente principal de los cálculos. Tampoco han sido positivas o significativas las relaciones entre él y el resto de sustancias en los 3 tipos de cálculos encontrados. Se ha aislado en 27 cálculos (27%), presentándose en el 66% de los del tipo de combinación, 55% de los pigmentarios, 33% de los de colesterol y sólo en el 21.9% de los mixtos.

Otro tipo de materiales como metales, palmitato de calcio (255), jabones cálcicos, ácidos grasos, sulfatos, fosfatos y carbonatos no se ha determinado (296,324) puesto que con este método microscópico de la lámina delgada no se especifican nada más de el colesterol, bilirrubinato, carbonato de calcio y la sustancia residual, que incluye diversas materias amorfas como proteínas. Estas no pueden detectarse por la falta de resolutivez del método para la determinación bioquímica de sustancias en cantidades ínfimas. En todo caso el aislamiento de las mismas queda lejos de del límite del presente trabajo pues deberían utilizarse técnicas de radioinmunoensayo. RUIZ DE AGUIAR sí ha iniciado la búsqueda del palmitato de calcio en los cálculos con este método, apareciendo como formaciones de aspecto plumoso de color blanco, pero está aún en su inicio. (250,255)

La morfología del cálculo así como de sus 4 componentes encontrados en ellos, se ha analizado al microscopio óptico con la lámina delgada, así como externamente y con lupa al estereomicroscopio.

Los cálculos con contenido de colesterol presentan 3 zonas bien diferenciadas que son similares en los de colesterol puro y en los mixtos. (248) El núcleo se forma por una zona más densa y que aparece más oscura que el resto. Microscópicamente parece tener una mezcla de bilirrubinato cálcico y sustancia residual como punto de origen de la concrección. Posteriormente se compone de más bilirrubinato que se apone al mismo. (247) De modo más objetivo y analista, se han hecho esquemas de la composición exacta de un cálculo en cada una de sus capas, mediante la difracción de rayos X o cristalografía de rayos X. (260,270,271)

En efecto, se comprueba que el punto de partida de la estructura calcu-  
losa es una matriz orgánica compuesta por un complejo proteico, con bilirrubi-  
nato e iones como han demostrado BEEN y BILLS (263). Encima de este núcleo  
se colocan en forma de capas el colesterol y el bilirrubinato cálcico (24,45,70)  
dando la conformación definitiva del cálculo. En los de colesterol puro existirá  
menos bilirrubinato, otorgándole al cálculo el color más blanco debido a la  
predominancia de los cristales del colesterol que se colocan además de manera  
paralela y radialmente desde el centro. En los de tipo mixto, estos dos mate-  
riales se disponen dando bandas alternas, que en el caso de los de combinación  
son de modo simétrico, hecho que los diferencia. (256)

La corteza o fase terminal, en la que se finaliza el crecimiento del  
cálculo (248) se forma en su mayoría por bilirrubinato, por lo que posee una  
coloración marrón más oscura que el resto de capas.

Cuando se observan estas imágenes al microscopio junto a aditamentos  
como los nicoles cruzados, surgen observaciones nuevas. Con ellos podemos  
diferenciar los cristales de colesterol que coinciden en la dirección de los  
nicosles, dado que toman unos colores de interferencia azules característicos.  
Esto nos lleva a poder determinar la disposición espacial de los cristales  
y a profundizar en el conocimiento de su etiopatogenia.

Si se añade la lámina compensadora de yeso de rojo de primer orden,  
las estructuras adoptan unas coloraciones típicas según la sustancia de que  
se trate, lo que nos hace diferenciarlos mucho más claramente y reconocer  
su distribución en el espacio y su colocación.

Estos aditamentos que se asocian a la observación de los cálculos en  
la lámina delgada por el microscopio, se han utilizado por RUIZ DE AGUIAR  
y cols. en España (248) pero no se han encontrado referencias bibliográficas  
sobre el método ni su aplicación a los cálculos biliares distintas a las de  
este grupo, por lo que no se pueden comparar resultados. Lo descrito por  
estos autores son hallazgos morfológicos fundamentalmente relativos a los  
cálculos de colesterol, dado que éstos son su principal motivo de estudio  
en lo publicado.



Los cálculos compuestos principalmente por pigmento son totalmente distintos. Son amorfos, sin que se distingan zonas; de color negro tanto externa como internamente y muy frágiles y deleznales, puesto que se convierten en barro o polvo con facilidad. (164,199,284) MAKI (199) ha expuesto que esta contextura podría deberse a alteraciones metabólicas y que cuando se forman por infecciones son más duros, pero no se ha demostrado.

La visualización de un corte de estos cálculos al microscopio demuestra la inexistencia de una forma definida, estando constituido por acúmulos de pigmento que se van uniendo entre sí para dar la totalidad del cálculo. Con los nicols cruzados no muestra imágenes de cristales salvo alguno de colesterol, y tampoco se evidencia que posea ninguna colocación específica. La sustancia residual en ellos alcanza cierta importancia viéndose en mayor cantidad que en el resto de los cálculos.

Con el proceso de deshidratación de debe realizarse para la obtención de la preparación de la lámina delgada, sufren una notable desestructuración, formándose unas grietas denominadas de retracción al contraerse el pigmento. Por ello se visualizan zonas en las que se trasparenta el cristal del portapreparaciones.

Estas observaciones han sido confirmadas en parte por los trabajos de RUIZ DE AGUIAR y su grupo, sobretodo en lo referido al estudio de los cálculos con contenido de colesterol. (248,250,251,255,256), no habiéndose logrado otros datos en la literatura que nos hayan dado la oportunidad de comparar nuestros hallazgos con los de otros autores. Si es de destacar que el análisis de los cálculos tanto en su composición cuantitativa como en su morfología, con el método de la lámina delgada no se había practicado con anterioridad en una serie grande de pacientes como la que se ha expuesto en el presente trabajo, lo que se considera una novedad en el campo de los estudios sobre litogénesis.

### 3.- RELACION ENTRE ESTUDIOS DE LA VESICULA BILIAR Y CALCULOS.-

Una de las intenciones de este trabajo ha sido descubrir la existencia de relaciones entre los factores generales del paciente portador de cálculos, como edad o enfermedades asociadas, sexo, etc., con los datos obtenidos de los estudios sobre la VB a nivel histoquímico y de la composición de los cálculos. Se ha tratado de dilucidar si las alteraciones histológicas o la producción de un determinado tipo de MP provocan la formación de cálculos con una especial composición.

La edad de los pacientes con cálculos biliares no se ha visto que se encuentre relacionada con el porcentaje de bilirrubinato cálcico, sobretudo interesándonos en los de tipo pigmentario, dado que algunos autores han observado una elevación del bilirrubinato con el avance de los años, hasta los 70-80 años (301), hecho no mostrado en nuestro trabajo.

Se ha encontrado una dependencia del contenido de carbonato cálcico y del bilirrubinato cálcico, en los cálculos de los pacientes que padecían cirrosis hepática asociada a la litiasis (306) y ha sido una correlación estadísticamente significativa. El bilirrubinato de sus cálculos, tampoco se ha mostrado que fuera superior a la media general cuando no contienen carbonato, según opina TROTMAN (284).

La cantidad de carbonato cálcico no se ha visto que tenga ninguna relación con otros factores, ni con ningún tipo de cálculo en concreto. NICHOLAS y cols. (306) han evidenciado que los cálculos que contienen carbonato poseen más cantidad de éste que si son cirróticos. Esta observación es compatible con el hecho hallado en nuestra serie, de la conexión existente entre el pigmento y el carbonato en los cálculos de los pacientes con cirrosis. Por ello pensamos que debe existir alguna explicación fisiopatológica a este hecho.

Del mismo modo, algunos autores (162) han visto que en los cirróticos, existe un predominio de los cálculos de tipo pigmentario, no habiéndolo evidenciado en el estudio de nuestra serie.

La alteración de la VB en los parámetros valorados sobre las consecuencias patológicas que sufre con la litiasis, tampoco han presentado una correlación con la formación de un tipo de cálculo en el que predomine el colesterol o el pigmento. Por ello, se considera que es una respuesta inespecífica a la agresión de la litiasis.

Estos cambios histológicos, no incitan a la producción de uno u otro tipo de MP en las células de la mucosa vesicular, y tampoco éstas se relacionan con la predominancia del colesterol o del bilirruginato en el cálculo.

Desde que han sido observados por algunos autores (2) 3 tipos distintos de gránulos secretorios en las células, se ha pensado que pudiera tener alguna conexión con el hecho de que son 3 las sustancias fundamentales que componen los cálculos (15,56). WOMAK (107), en base a esta idea, opina que el tipo de cálculo está en relación con las MP de la VB. Esta hipótesis no se ha demostrado por los estudios practicados en nuestro trabajo, dado que los componentes del cálculo no se han visto relacionados con las MP ni con los cambios de la mucosa. Tampoco se han correlacionado ni con la cantidad de MN ni con la de MAPS. Sin embargo, con la MAMS sí lo han hecho, aunque esta relación no ha sido estadísticamente muy valorable. Por esto no se ha considerado una función consistente. Es posible que pueda analizarse este hallazgo de otro modo, y obtenerse conclusiones definitivas. Cabe pensar que existan interrelaciones entre estos tipos de MP detectados en la mucosa con alteraciones histológicas, y el contenido tanto de colesterol como de bilirruginato cálcico de los cálculos.

Otras investigaciones podrían arrojar más luz sobre esta cuestión.

## CONCLUSIONES.

1.- La vesícula biliar con litiasis ha presentado alteraciones histológicas de la mucosa en todos los pacientes. En el 90% han sido de grado leve o moderado, fundamentalmente atrofia de las vellosidades y fibrosis de la pared.

2.- Estas alteraciones histopatológicas de la mucosa vesicular conducen a un estado inflamatorio y a una hipersecrección de mucoproteínas, las cuales se localizan en forma de gránulos en el polo apical de las células del epitelio de revestimiento y de las glándulas.

3.- Las glándulas de la mucosa vesicular son el lugar de mayor producción de mucoproteínas. Mientras que las de tipo neutro y ácidas muy sulfatadas se generan fundamentalmente a este nivel, las ácidas poco sulfatadas no presentan un lugar preferente de secrección.

4.- Desde un punto de vista arquitectural, las mucoproteínas ácidas muy sulfatadas, se distribuyen focalmente en la mucosa, mientras que las neutras y ácidas poco sulfatadas lo hacen de manera difusa.

5.- A nivel celular, la distribución dispersa de las mucoproteínas conlleva una mayor concentración de las mismas, lo que refleja una lesión histológica más grave.

6.- En el epitelio de revestimiento de la vesícula biliar, las mucoproteínas neutras y las ácidas poco sulfatadas se presentan como gránulos de secrección en el 100% de las vesículas, lo que ocurre sólo en el 46% de las ácidas muy sulfatadas. Sin embargo, a nivel glandular se encuentran los 3 tipos de mucoproteínas en el 56% de los casos.

7.- Los cambios histológicos producidos en la vesícula litíásica, no determinan el tipo de cálculo ni favorecen la secrección de una mucoproteína concreta.



8.- Existe una correlación estadísticamente significativa entre la producción de mucoproteínas ácidas de tipo sulfatado y poco sulfatado, dentro de una misma vesícula biliar. ( $p < 0.05$ )

9.- Los cálculos con predominio de colesterol poseen una estructuración con 3 partes bien definidas. Los cálculos pigmentarios son totalmente amorfos y no presentan estructuración ninguna. En ambos, el núcleo se compone de pigmento y sustancia residual de probable origen proteico.

10.- Los cristales de colesterol se disponen especialmente de manera paralela, formando haces que convergen en el núcleo y depositándose en capas alternativas con el pigmento o bilirrubinato. En el caso de los cálculos de combinación, estas bandas son simétricas en su alternancia, hecho que los caracteriza.

11.- La cantidad de cristales de colesterol en los cálculos está relacionada con el contenido de bilirrubinato cálcico, de manera estadísticamente significativa. ( $p < 0.32 \times 10^{-52}$ ) Esta correlación no se ha encontrado en los cálculos de combinación ni en los pigmentos.

12.- En los cálculos pigmentarios, la correlación entre el contenido de bilirrubinato cálcico y sustancia residual es estadísticamente significativa. ( $p < 0.05$ )

13.- No se ha encontrado ninguna relación entre la edad de los pacientes y el contenido de bilirrubinato de los cálculos.

14.- En los pacientes que padecen cirrosis hepática y litiasis biliar, no se ha observado una mayor incidencia de cálculos pigmentarios. En estos enfermos, la cantidad de bilirrubinato de los cálculos presenta una correlación estadísticamente significativa con el porcentaje de cristales de carbonato cálcico. ( $p < 0.015$ )

**BIBLIOGRAFIA.**

- 1.- DUMONT A.E.; MARTELLI A.B.; SCHINELLA R.A.; VALENSI Q.J. Trans-mural fluid movement in the freshly excised human gallbladder. Surg Gynecol Obstet 1982 (Aug); 155: 203-207.
- 2.- BLOOM W.; FAWCETT D.W.; Hígado, conductos biliares y vesícula biliar. En: Tratado de Histología. Ed. LABOR S.A. Argentina. 9ª ed. 1973; 688-693.
- 3.- ELFVING G. Crypt and ducts in the gallbladder wall. Acta Pathol Microbiol Scand 1960; 49 (Suppl 135): 1-45.
- 4.- HULTEN O. Formation of gallstones.(I) Acta Quir Scand 1968; 134: 125.
- 5.- TUSQUES J.; SENELAR R.; GINGUNE Y. et al. Etude histoclinique sur les vésicules biliaires de mouton et de cobaye: les mucopolysaccharides. Acta Histochem 1964; 9: 269-276.
- 6.- BOUCHIER J.A.D. Macromolecular material in bile and its relation to gallstone formation. South Afr Med J 1966; 40: 735-738.
- 7.- EVETT R.D.; HIGGINS J.A.; BROWN A.L. The fine structure of normal mucosa in human gallbladder. Gastroenterology 1964; 47: 49-69.
- 8.- FOX H. Ultrastructure of the human gallbladder epithelium in cholelithiasis and chronic cholecystitis. J Path 1972; 108: 157-163.
- 9.- WHALIN T.; BLOOM G.D.; CALSOO B.; RHODIN L. Effects of fasting and refeeding on secretory granules of the mouse gallbladder epithelium. A quantitative electron microscopic study. Gastroenterology 1976; 70: 353-358.
- 10.- LUCIANO L.; REDE E. A new morphological aspect of the brush cells of the mouse gallbladder epithelium. Cell Tissue Res 1979; 201: 37-44.
- 11.- POIRIER J.; CHEVREAU J. Cuadernos de Histología humana. Fascículo 4: tubo digestivo, hígado, vías biliares y páncreas exocrino. Ed. MARBAN.

Madrid. 1974.

12.- RALPH P.H. Surface structure of gallbladder and intestinal apithelium of man and monkey. *Anat Rec* 1950; 108: 217-222.

13.- PHILLIPS M.J.; ODA M.; MAK E.; FISHER M.M; JEEJEEBHOY K.N. Microfilament dysfunction as a possible cause of intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 1975; 69: 1: 48-58.

14.- MUELLER J.C.; JONES A.L.; LONG J.A. Topographic and subcelular anatomy of the guinea pig gallbladder. *Gastroenterology* 1972; 63, 5: 856-868.

15.- CHAPMAN G.B.; CHIARODO A.J; COFFEY R.J; WIENEKE K. The fine structure of mucosal epithelial cell of pathological human gallbladder. *Anat Rec* 1966 (mar); 154 (3): 579-615.

16.- ELHAMADY M.S.; HOPWOOD D.; WILNE G.; ROSS P.; BOUCHIER I.A.D. Tissue culture of guinea-pig gallbladder epithelium. *J Pathol* 1983; 140: 221-235.

17.- WHALIN T. Synthesis of glycoproteins in the Golgi complex of the mouse gallbladder epithelium durins fasting, refeeding and gallstone formation. A light microscopic autorradiografic and quantitative electron microscopic study. *Histochemistry* 1977; 51: 133-140.

18.- YAMADA E. Fine structure of gallbladder epithelium of mouse. *J Biphys Biochem Cytol* 1955; 1: 445-458.

19.- LAITIO M. Morphology and histochemistry of non-tumorous gallbladder epithelium. A series of 103 cases. *Path Res pract* 1980; 167: 335-345.

20.- ROBBINS S.L. Sistema biliar. En: *Patología estructural y funcional*. Ed. Interamericana. 1977; 1003-1016.

21.- HULTEN O. Contractions of the gallbladder and the formation of gallsto-

nes. (III) Acta Chir Scand 1970; 136: 53-56.

22.- FRESTON J.W.; BOUCHIER J.A.; NEUMAN J. Biliary mucous substances in dihydricholesterol-induced cholelithiasis. Gastroenterology 1969 (dec); 57 (6): 670-678.

23. MORSON B.C. Gastric polyps composed of intestinal epithelium. Brit J Cancer 1955; 9: 550-557.

24.- KING E.S.J.; McCALLUM D. Cholecystitis glandularis proliferans. (cystica) Brit J Surg 1931; 19: 310-323.

25.- HAYWARD A.F.; FRESTON J.W.; BOUCHIER J.A.D. Changes in the ultrastructure of gallbladder epithelium in rabbits with experimental gallstones. Gut 1968; 9: 550-556.

26.- VELO BELLVER J.L.; ALVAREZ E.; ALCALA SANTAELLA R. Estructura y ultraestructura hepática y vesicular en los litiásicos. Rev Esp Enf Ap Digest 1973; XL: 127-138.

27.- SCHAFF Z.; LAPIS K.; CSIKOS A. Scanning electron microscopic study of human gallbladder mucosa in cholelithiasis. Acta Morphol Acad Sci Hung 1977; 25 (1): 107-114.

28.- LOPEZ A.; VILCHES J.; BENVENUTY R.; BARDET L.; GOMEZ J. Aplicación de la microscopía electrónica de barrido en el estudio de la litiasis biliar. I. Revestimiento mucoso. Rev Esp Enf Ap Digest 1982; 61 (2): 113-116.

29.- WILLIAMS A.E.; SMITH A.N. A scanning electron microscope study of normal and pathological human gallbladder. Scanning Electron Microscopy 1978; II: 713-718.

30.- REPASSY G.; SCHAFF Z.; LAPIS K.; MARTON T.; JAKAB F.; SUGAR I. Mucosa of the Heister Valve in cholelithiasis. Arch Pathol Lab Med 1978; 102: 403-405.

- 31.- FINBERG H.J.; birnholz J.C. Ultrasound evaluation of the gallbladder wall. Radiology 1979; 133: 693-698.
- 32.- PUTZ P.; WILLEMS G. Cell proliferation in the human gallbladder epithelium. The effect of the distension. Gut 1979; 20: 246-248.
- 33.- LEROY F.; VAN HOECK J.; BOGART C. Effect of uterine distension and oestradiol on cell kinetics in the endometrial epithelium of ovariectomized rats. Cell Tiss Kinet 1977; 10: 437-445.
- 34.- CREAN G.P.; HOGG D.F.; RUMSEY R.D.E. Hyperplasie of the gastric mucosa produced by duodenal obstruction. Gastroenterology 1969; 56: 193-199.
- 35.- PUTZ P.; WILLEMS G. Proliferative changes in the epithelium of the human lithiasis a gallbladder. J Natur Cancer Instit 1978 (Feb); 60 (2): 283-286.
- 36.- SCOTT A.J. Lincomycin-induced cholecystitis and gallstones in guinea pigs. Gastroenterology 1976; 71: 814-820.
- 37.- WHALIN T. Effects pf lithogenic diets on mouse gallbladder epithelium. A histochemical, cytochemical and morphometric study. Virchows Arch B Cell Path 1976; 22: 273-286.
- 38.- KAYE G.I.; MAENZA R.M.; LANE N. Cell replication in rabbit gallbladder. Gastroenterology 1966; 51: 670-680.
- 39.- PARKASH O. On the relationship of cholelithiasis to carcinoma of the gallbladder and on the sex dependency of the carcinoma of the bile ducts. Digestion 1975; 12: 129-133.
- 40.- LAMOTE J.; PUTZ P.; FRANCOIS M.; WILLEMS G. DNA synthesis index: higher for human gallbladder with cholesterol gallstones than with pigment gallstones.

- 41.- SCOTT A.J. Epithelial cell proliferation in diverse models of experimental cholelithiasis. *Gut* 1978; 19: 558-562.
- 42.- DOYY J.E.; PITT H.A.; KUCHENBECKER S.L.; PORTER-FINK V.; DEBENSTEN L.W. Role of gallbladder mucus in the pathogenesis of cholesterol gallstones. *Am J Surg* 1983; 145: 54-61.
- 43.- LEE S.P. Hypersecretion of mucus glycoprotein by the gallbladder epithelium in experimental cholelithiasis. *J Pathology* 1981; 134: 199-207.
- 44.- PUTZ P.; WILLEMS G. Effect of a lithogenic diet on cell proliferation in the murine gallbladder epithelium. *Digestion* 1981; 22: 16-23.
- 45.- SCOTT A.J. Are there proliferative compartments in the gallbladder? *Gastroenterology* 1974; 67: 1231-1237.
- 46.- SCHWEICHEL J.V.; MERKER H.J. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 1973; 7: 253-266.
- 47.- MARSCH-ZIELER U.; PALME G. Einfluß von lithogener Diät und Hunger auf die Epithelregeneration der Gallenblase. *Leber Magen Darm* 1982; 14, 2: 157-161.
- 48.- NAHRWOLD D.L.; ROSE R.C.; WARD S.P. Abnormalities in gallbladder morphology and function in patients with cholelithiasis. *Ann Surg* 1976; 184: 415-421.
- 49.- LEE S.P.; SCOTT A.J. The evolution of morphologic changes in the gallbladder before stone formation in mice fed a cholesterol-cholic acid diet. *Am J Path* 1982 (July); 108: 1-8.
- 50.- ZIEGLER U.; PALME G.; MERKER H.J. Morphological alterations in epithelial cells of the mouse gallbladder 30 hours after treatment with lithogenic diet. *Path Res Pract* 1982; 174: 116-130.

- 51.- ENOMOTO M.; NAOE S.; HARADA M.; MIYATA K.; SAITO M.; NOGUCHI Y. Carcinogenesis in extrahepatic bile duct and gallbladder carcinogenic effect on N-Hydroxy-2 acetamidofluorene in mice fed a "gallstone-induced" diet. Japan J Exp Med 1974; 44, 1: 37-54
- 52.- FRESTON J.W.; BOUCHIER J.A.D. The influences of total vagotomy on dihydrocholesterol-induced cholelithiasis in rabbits. Gastroenterology 1968; 54: 153-159.
- 53.- ELFVING G. Crypts and ducts in the gallbladder wall. Acta Pathol Microbiol Scand 1960. Suppl 135.
- 54.- HOPWOOD D.; KOUROUMALIS E.; MILNE G.; BOUCHIER J.A.D. Cholecystitis: a fine structures analysis. J Pathol 1980; 130: 1-13.
- 55.- SCHEIDEGGER A.; PREISIG R.; STIRNEMAN H. Hydrops der gallenblase. Der Chirurg 1980; 51: 213-218.
- 56.- ROSLYN J.J.; DENBESTEN L.; PITT H.A. Effects of cholecystokinin on gallbladder stasis and cholesterol gallstone formation. J Surg Res 1981; 30: 200-204.
- 57.- HULTEN O. Formation of gallstones .II. Acta Quir Scand 1968; 134: 557.
- 58.- LAITIO M.; NEVALAINEN T. Ultrastructure of endocrine cells in metaplastic epithelium of human gallbladder. J Anat 1975, 120, 2: 219-225.
- 59.- HOUSSIN P.; CASTAING D.; LEMOINE J.; BISMUTH H. Microlithiasis of the gallbladder. Surg Gynecol Obstet 1983 (July) 157: 20-24.
- 60.- RUBIN W. Endocrine cells in the normal human stomach. A fine structural study. gastroenterology 1972; 62: 784-800.
- 61.- VASALLO G.; SOLCIA E.; CAPELLA C. light and electron microscopic



identification of several types of endocrine cells in the gastrointestinal mucosa of the cat. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 1969; 98: 333-356.

62.- BOER W.G.R.M. de; NAIRN R.C. Intestinal metaplasia in gallbladder: an immunohistological study. *Pathology* 1972; 4: 129-132.

63.- WHEELER H.O. Concentrating function of the gallbladder. *Am J Med* 1971; 51: 588-595.

64.- DIAMOND J.M. The rebsorptive function of the gallbladder. *J Phisiol* 1962; 161: 442-447.

65.- DIAMOND J.M. The concentrating activity of the gallbladder. En: *The biliary sistem*, edited by W. Taylor. Philadelphia. F.A. Davis Co. 495-511.

66.- BANFIELD W.J. Phisiology of the gallbladder. *Gastroenterology* 1975; 69: 770-777.

67.- TORMEY J McD.; DIAMOND J.M. The ultrastructural route of fluid transport in rabbit gallbladder. *J Gen Phisiol* 1967; 50: 2031-2060.

68.- DIETSCHY J.M. Recent developments in solute and vwater transport across the gallbladder epithelium. *Gastroenterology* 1966; 55: 692-707.

69.- SVANVIK J.; THORNELL E.; ZETTERGREN L. Gallbladder function in experimental cholecystitis. *Surgery* 1981; 89: 500-506.

70.- ONSTAD G.R.; SCHOENFIELD L.J.; HIGGINS J.A. Fluid transfer in the everted human gallbladder. *J Clin Invest* 1967; 46: 606-614.

71.- KAYE G.I.; WHEELER H.O.; WHITLOCK R.T. Fluid transport in the rabbit gallbladde. A combined phisiological and electron microscopic study. *J Cell Biol* 1966; 30: 237-268.

- 72.- CURRAN P.T.; MACINTOSH J.R. A model system for biological water transport. *Nature* 1962, 193: 347-348.
- 73.- O' GILVIE J.T.; McINTOSH J.R.; CURRAN P.F. Volume flow in a series-membrana system. *Biochim Biophys acta* 1963; 66: 441-453.
- 74.- WEIGHT E.M.; SMULDERS A.P.; TORMEY J.Mc.D. The role of the lateral intercelular spaces and solute polarization effects in the persive flow of water across the rabbit gallbladder. *J Membr Biol* 1972; 7: 198-219.
- 75.- DIAMOND J.M.;TORMEY J.Mc.D. Role of long extracelular channels in fluid transport across epithelia. *Nature* 1966; 210: 817-820.
- 76.- GOMPPER H.J. Uber das Schleimastige Sekret del gallenblase. *J Moorphol Mikrosk Anat* 1951; 57: 280-303.
- 77.- JUNIPER K.J.R. The relationship of a biliary lipoprotein "complex" to some theories of gallstone formation. *Amer Surgeon* 1958; 24: 45-57.
- 78.- WOOD J.R.; STAMFORD I.F. Prostaglandins in chronic cholecystitis. *Prostaglandins* 1977; 13: 97-107.
- 79.- SCHAFFER D.E.; LUST W.D.; POLSON J.B. The studies on the posible role of the cyclic AMP in same actions of cholera toxin. *Ann N.Y. Acad Sci* 1971; 185: 376-385.
- 80.- SVANVIK J.; THORNELL E.; WOOD J.R. Effects of prostaglandins E<sub>2</sub> on gallbladder function in the cat. *Physiol. London*. 1980. 305: 104.
- 81.- MORTON J.K.M.; SAVERYMUTTU S.H.; WOOD J.R. Inhibition by prostaglandins of fluid transport in the isolated gallbladder of the guinea pig. *Br J Pharmacol* 1974; Abst. 50: 460.
- 82.- SCHAFER D.E.; NICOLOFF D.M.; GLEASON D.F. y cols. Gallbladder secretion induced by an enterotoxinlike fraction of crude v. cholerae superna-

tant. Gastroenterology 1969; Abst. 56: 1195.

83.- NOVAK J. Prostaglandins in the cardiovascular system in man. Acta Physiol Scand (suppl) 1979, 479.

84.- NAUNYN B. A treatise on cholelithiasis. Jons Hopkins Med J. 1898; 9: 91-96.

85.- HOLZBACH R.T.; MARSH M.; TANG P. Cholesterolosis: physical-chemical characteristics of human and diet-induced canine lesions. Exp Mol Path 1977; 27: 324-338.

86.- NICKERSON W.R.; BOSCHETTI A. Heterotopic gastric mucosa of gallbladder. Am Jour Surg 1973; 125: 345-346.

87.- WOMACK N.A. the developmen of gallstones . Surg Gynecol Obstet 1971 (dec); 133: 937-945.

88.- THORNELL E.; KRAL J.G.; JANSON R.; SVANVIK J. Inhibition of prostaglandin synthesis as a treatment for biliary pain. Lancet 1979; 1: 584.

89.- JANSSON R.; SVANVIK J. Effects of intravenous secretin and cholecystokinin on gallbladder net water absortion and motility in the cat. Gastroenterology 1977; 72: 639-643.

90.- JANSSON R.; STEEN G.; SVANVIK J. Effects of intravenous vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on gallbladder function in the cat. gastroenterology 1978; 75: 47-59.

91.- BOUCHIER J.A.D. Gallstone formation. Lancet 1971; 1: 711.

92.- JORPES J.E. The isolation and chemistry of secretin and cholecystokinin. Gastroenterology 1968; 55 (2): 157-164.

93.- LaMORTE W.W.; SCHOETZ D.J.; BIRKETT D.H.; WILLIAMS L.F. Jr. The role of the gallbladder in the pathoogenesis of cholesterol gallstones.

Gastroenterology 1979; 77: 580-592.

94.- TSUNG-MIN LIN. Actions of gastrointestinal hormones and related peptides on the motor function of the biliary tract. gastroenterology 1975; 69, 4: 1006-1022.

95.- FORSTNER J.F. Intestinal mucins in health and disease. Digestion 1978; 17: 234-263.

96.- WALDMAN D.B.; AFASS A.M.; MAKLOUF G.M. Stimulatory ( $H_1$ ) and inhibitory ( $H_2$ ) histamine receptors in gallbladder muscle. Gastroenterology 1977; 72: 932-936.

97.- FIELD E.S. Gallstone after peptic ulcer surgery. Brit Med j. 1971; 1: 708-710.

98.- ANDERSON J.R.; McLEAN ROSS A.H.; DIN N.A.; SMALL W.P. Cholelithiasis peptic ulcer surgery: a prospective controlled study. Br J Surg 1980; 67: 618-620.

99.- LIEBERG G. The effect of vagotomy on gallbladder and duodenal pressures durin rest and stimulation with cholecystokinin. Acta Chir Scand 1969; 135: 695-700.

100.- GOMEZ LAZARO C.; PRIETO VALTUEÑA J. Etiopatogenia de la colelithiasis. Rev Clin Esp 1973; 129, 4º: 315-322.

101.- RUPPIN D.C.; DOWLING R.H. Is recurrence inevitable after gallstone dissolution by bile-acid treatment? Lancet 1982 (Jan); 23: 181-185.

102.- ERLINGER S. Les mecanismes de la secretion biliaire. Rev Int Hepat 1968; 1: 18-25.

103.- HOUSSAY B.A. Fisiología humana. Ed. Librería "El Ateneo". Buenos Aires. Argentina 1978; sección V. Digestion. 21: 346-350.

- 104.- ERLINGER S. La cholestase: Données physiopatologic et cliniques recentes. Cahiers de Medinine 1970; 11: 983-990.
- 105.- LORENTE L. Nuevos conceptos en la patogenia de la litiasis biliar. Bol Fund Jimenez Díaz 1970; 2: 69.
- 106.- TERA H. The passage of calcium into the gallbladder through its wall. Acta Chir Scand 1961; 120: 358-362.
- 107.- WOMAK N.A.; ZEPPA R.; IRVIN G.L. III. The anatomy of gallstones. Ann Surg 1963; 157: 670-686.
- 108.- CAREY M.C.; SMALL D.M. The characteristics of mixed micelar solutions with particular reference to bile. Amer J Med 1970; 49: 590-597.
- 109.- SMALL A.M. Surface and bulk interaction of lipids and water with a clasification of biologically active lipids based on these interactions. Fed Proc 1970; 29: 1320-1332.
- 110.- THORNTON J.R.; EMMETT P.M.; HEATON K.W. Diet and gallstones: effects of refined and unrefined carbohydrate diets on bile cholesterol saturation and bile acid metabolism. GUT 1983; 24: 2-6.
- 111.- CAREY M.C.; SMALL D.M. Micelle formation by bile salts. Arch Intern Med 1972; 130: 506-527.
- 112.- SOLIS HERRUZO J.A.; RODRIGUEZ AGULLO J.L. Mecanismo de la formación de cálculos biliares de colesterol. I. Fisiopatología de la formación de cálculos. Rev Clin Esp 1977; 147, 5: 447-452.
- 113.- LENHINGER A.L. Azúcares, polisacáridos de reserva y paredes celulares. En: Bioquímica. Ed. Omega S.A. Barcelona 1979; 279-282
- 114.- NAGASHIMA H.; SUZUKI N.; YOSIZAWA Z. Coagulating effect on calcium carbonate of sulfated glycoprotein isolated from pathological human

bile. Tohoku J Exp MD 1974; 113: 159-168.

115.- ADMIRAND W.H.; SMALL D.M. The physiochemical basis of cholesterol gallstone formation in man. Jour Clin Invest 1968; 47: 1043-1052.

116.- ISAKSSON B. On the dissolving power of lecithin and bile salts for cholesterol in human bladder bile. Acta Soc Med Ups 1954; 54: 296-306.

117.- SOLIS HERRUZO J.A.; RODRIGUEZ AGULLO J.L. Mecanismo de la formación de cálculos biliares de colesterol. II. Causas de bilis litogénica. Rev Clin Esp 1977; 147, 5: 453-460.

118.- REDINGER R.N.; SMALL D.M. Bile composition, bile salts metabolism and gallstones. Arch Intern Med 1972 (Oct), 130: 618-630.

119.- HERMON R. The enterohepatic circulation. Gastroenterology 1972 (Jan) 62 (1): 122-140.

120.- NORMAN A.; SJOVALL J. On the transformation and enterohepatic circulation of cholic acid in the rat. Bile acids and steroids 68. J Biol Chem 1958; 233: 872-885.

121.- SMALL D.M.; DOWLING R.H.; REDINGER R.N. The enterohepatic circulation of bile salts Arch Intern Med 1972 (Oct) 130: 552-573.

122.- SMALL H.C.; DIETSCHY J.M. Characterization of the monomer and micelle components of the passive diffusion process of bile acids across the small intestine of the rat. (Abstract) Gastroenterology 1968; 54: 1272.

123.- POMARE E.W.; HEATON K.W. Bile salts metabolism in patients with gallstones in functioning gallbladders. Gut 1973; 14: 885-893.

124.- PERRY M.; WHITE J.; DOWLING R.H. Bile acid absorption by jejunum and colon after ileum resection in the rat. Br J Surg 1972; 59: 345-352.

125.- DAYNE J.H.; DE WIND L.T.; COMMONS R.R. Metabolic observations

in patients with jejunocolic shunts. Am J Surg 1963, 106: 273-289.

126.- KEKHJIAN H.S.; PHILLIPS S.F.; HOFMANN A.F. Colonic secretion of water and electrolytes induced by bile acids perfusion studies in man. J Clin Invest 1971; 50: 1569-1575.

127.- DIETSCHY J.M. Mechanism for the intestinal absorption of the bile acids. J Lipid Res 1968; 9: 297-309.

128.- LACK L; WEINER I.M. The role of the intestine during the enterohepatic circulation of the bile salts. Gastroenterology 1967; 52: 282-287.

129.- DARNIS F.; POUPON R. Graisses alimentaires et lithiase biliaire cholestérique. Med Chir Dig 1979; 8: 221-224.

130.- BOUCHIER J.A.D. Postmortem study of the frequency of gallstones in patients with cirrhosis of the liver. Gut 1969; 10: 705-709.

131.- MORTENSSON K.M. The incidence of gallstone in Sweden. The correlation of gallstones with various diseases and pathological changes. Arch Surg 1937, 34: 650-661.

132.- LESTER R.; SCHMID R. Intestinal absorption of bile pigments. II. Bilirubin absorption in man. N Engl J Med 1963; 269: 4-10.

133.- HERBERT V. Excretion of folic acid in bile. Lancet 1965, 1: 913.

134.- SCHOENFIELD L. Biliary excretion of antibiotics. N Engl J Med 1971, 284: 1213-1214.

135.- REDINGER R.N.; SMALL D.M. The effect of phenobarbital on bile salt metabolism and cholesterol secretion in the primate. J Clin Invest 1971; 50: 76-82.

136.- OSLER W.B. The principles and practice of medicine. Edin Surg. Pentland 1892: 432.

- 137.- REIZENSTEIN P. Excretion of non-label vitamin in man. Acta Med Scand 1960; 165: 1-7.
- 138.- GRUNDY S.M.; AHRENS E.H.; DAVIGNON J. The interaction of cholesterol absorption and cholesterol in man. J Lipid Res 1969; 10: 304-315.
- 139.- THISTLE J.L.; SCHOENFIELD L.T. Lithogenic bile among young Indian women lithogenic potential decreased with chenodeoxycholic acid. New Engl J Med 1971; 284: 177-181.
- 140.- BISS K.; HANG-JEY H.O.; MIKKELSON B. Some unique biologic characteristics of the Masai of East Africa. New Engl J Med 1971; 284: 694-699.
- 141.- NAKAYAMA F.; VAN DER LINDEN W. Bile composition: Sweden vs Japan. Amer J Surg 1971; 122: 8-12.
- 142.- DAM H.; KRUSE J.; KALLEHAUGE H.E. et al. Studies on human bile. Scand J Clin Lab Invest 1966; 18: 385-404.
- 143.- PITT H.A.; KING III W.; MANN L.L.; ROSLYN J.J.; BERQUIST W.E.; AMENT M.E.; DENBESTEN L. Increased risk of cholelithiasis with prolonged total parenteral nutrition. Am Jour Surg 1983 (jan) 145: 106-112.
- 144.- VAN DER LINDEN W.; NAKAYAMA F. Effect of intravenous fat emulsion on hepatic bile increased lithogenicity and crystal formation. Acta Chir Scand 1976; 142: 401-406.
- 145.- THEDOR E.; SPRITZ N.; SLEISENGER M.H. Metabolism of intravenously injected isotopic cholic acid in viral hepatitis. Gastroenterology 1968, 55: 183-190.
- 146.- CAREY J.B.Jr.; HANSON R.M.; MONSON B.K. Primary bile salt synthesis in human liver injury (abstract). Gastroenterology 1969; 56: 1142.
- 147.- REDINGER R.N.; STRASBERG S.; SMALL D.M. Effects of acute biliary tract obstruction on bile salt and biliary lipid metabolism. Clin Res 1971;



19: 401.

148.- REDINGER R.N.; HERMAN A.; SMALL D.M. Effects of biliary tract obstruction and illness on total secretion and relative composition of biliary bile salt, phospholipid and cholesterol in the rhesus monkey. *Gastroenterology* 1970; 58: 1058-163.

149.- VLAHCEVIC Z.R.; BELL C.C. Jr.; BUHAC J. Disminished bile acid pool size in patients with gallstones. *Gastroenterology* 1970; 59: 165-173.

150.- AUSTAD W.J.; LACK L.; TYOR M.P. Importance of bile acids and of an intact distal small intestine for fat absorption. *Gastroenterology* 1967; 52: 638-646.

151.- HOFMANN A.F.; THISTLE J.L. Patogenesis y tratamiento médico de los cálculos biliares de colesterol. *Rev Esp Enf Ap Digest* 1978; LIII, 2: 181-192.

152.- SCHAFFNER F.; POPPER H. Cholestasis is the result of lipoactive hypertrophic endoplasmic reticulum in the hepatocyte. *Lancet* 1969; 2: 355-357.

153.- GOMEZ LAZARO C.; PRIETO VALTUEÑA J.; CARO-PATON GOMEZ A.; COCA GARCIA M<sup>a</sup> C.; CASTRO DEL POZO S. de. Ultraestructura hepática en la coleditiásis. *Rev Esp Enf Ap Digest*. 1973; XL, 127-138.

154.- BATESON M.C. Dissolving gallstones. *Br Med Jour* 1982 (Jan); 284: 1-3.

155.- AL-KINANI A.T.; HARRIS J.A.; WATT D.E. Analysis of minor and trace elements in gallstones by induction characteristics ionisins radiation. *Phys Med Biol* 1984; 29, 2: 175-184.

156.- ALCALA SANTAELLA R.; BOLEA P.; GOMEZ M.; VELO BELLVER J.L. Comparación de la composición bioquímica de la bilis y suero entre litiási-

cos biliares y controles normales. Rev Clin Esp 1973; 130, 2: 103-110.

157.- MOORE E.W.; CELIC L.; OSTROW D. interactions between ionized calcium and sodium taurocholate: bile salts are important buffers for prevention of calcium-containing gallstones. Gastroenterology 1982; 83: 1079-1089.

158.- TROTMAN B.W.; OSTROW J.D.; SOLOWAY R.D. Pigment vs cholesterol cholelithiasis: a comparison of stone and bile composition. Am J Dig Dis 1974; 19: 585-591.

159.- ABRAMS R.H.; TROTMAN B.W.; SOLOWAY R. Gallbladder bile from patients with pigment stones is undersaturated with cholesterol despite decreased gallbladder function. (Abstract)Gastroenterology 1977; 74: 1002.

160.- IZUMI K. Studies on the chemical composition of gallbladder bile and gallstone; especially on the difference in the process of gallstone formation between cholesterol stone and bile pigment stone. Fukuoka Acta Med 1965; 56: 488-523.

161.- SOLOWAY R.D.; TROTMAN B.W.; OSTROW J.D. Pigment gallstones. Gastroenterology 1977; 72: 167-182.

162.- TROTMAN B.N.; SOLOWAY R.D. Pigment vs cholesterol cholelithiasis: clinical and epidemiological aspects. Am J Dig Dis 1975; 20: 735.

163.- NAKAYAMA F.; VAN DEL LINDEN W. Bile from gallbladder harbouring gallstones: can it indicate stone formation. Acta Chir Scand 1970; 156: 605-610.

164.- SUZUKI N.; NAKAMURA Y.; KOBAYASHI N.; SATO T. On metal elements in pure pigment gallstones. Tohoku Jour Exp Med 1975; 116: 259-264.

165.- JUNIPER K. Jr. Physicochemical characteristics of bile and their relation to gallstones formation. Am J Med 1965; 39: 98-107.

166.- BOUCHIER I.A.P.; COOPERBAND S.R. Isolation and characterization

of a macromolecular aggregate associated with bilirubin. Clin Chim Acta 1967; 15: 191-302.

167.- DEVERS T.J.; GALLO P.; OSTROW J.D. Effects of biliary lipids and pH on the solubility of unconjugated bilirubin. (VCB) Gastroenterology 1975; 68: 1082-1088.

168.- TERA H. Stratification of human gallbladder bile in vivo. Acta Chir Scand 1960; 256: 1-85.

169.- BOGREN H.; LERSSON N. On the pigment in biliary calculi. Scand J Clin Lab Invest 1963; 15: 569-572.

170.- TOYODA M. Quantitative determination of calcium bilirubinate in gallstones by infrared spectroscopy. Tohoku Exp Med 1966; 90: 303-316.

171.- FRITZ M.E.; BROOKS F.P. Control of bile flow in the cholecystectomized dog. Am J Physiol 1963; 204: 825-828.

172.- MAKI T. Pathogenesis of calcium bilirubinate gallstone; role of E. Coli,  $\beta$ -glucuronidase and coagulation by inorganic ions, polyelectrolytes and agitation. Ann Surg 1966; 164: 90-104.

173.- BELL G.D.; DOWLING R.H.; WHITNEY B.; SUTOR D.J. The value of radiology in predicting gallstone type when selecting patients for medical treatment. Gut 1975; 16: 350-357.

174.- MAKI T.; SATO T.; SAITO T. A study on the activity of  $\beta$ -glucuronidase in bile in connection with precipitation of calcium bilirubinate. Tohoku J Exp Med 1962; 77: 179-186.

175.- WAGNER C.; TROTMAN B.W.; SOLOWAY R.D. Biliary lipid excretion in pigment and cholesterol gallstone patients. Gastroenterology 1975; 68: 1085. (Abstract)

176.- TROTMAN B.W.; PETRELLA E.; SOLOWAY R.D. et al. Evaluation

of radiographic lucency or opaqueness of gallstones as a means of identifying cholesterol or pigment stones. Correlation of lucency or opaqueness with calcium and mineral. *Gastroenterology* 1975; 68: 1563-1566.

177.- TRALLE A. of. Citado en: RAINS A.J.H. Gallstones. Causes and treatment. Springfield. Ill. Charles C.Thomas. 1964. p.1.

178.- HOPPE-SEYLER H. Nothnagel's Encyclopedia of practical Medicine. American edition. Philadelphia WB. Sanders Co. 1903.

179.- MAJOR R.H. Classic description of disease. Springfield. Charles C. Thomas. 1945.

180.- FRERICHS F.T. A clinical treatise on diseases of the liver. Vol. III. Translated by Charles Murchison. New York. William Woodrand Co. 1879.

181.- RAINS A.J.H. Gallstones: causes and treatment. Charles C. Thomas. Springfield Ill. 1967; 188-201.

182.- LEV R.; SPICER S.S. A histochemical comparison of human epithelial mucins in normal and in hypersecretory states including pancreatic cystic fibrosis. *Am J Pathol* 1965; 46: 23-31.

183.- ORD W. On the influence of colloids upon crystalline form and cohesion with observations on the structure and mode of formation of urinary and other calculi. London. Stanford. 1879.

184.- ROUS P.; Mc MASTER P.D.; DRURY D.R. Observations on some causes of gallstone formation. I. Experimental cholelithiasis in the absence of stasis infection and gallbladder influences. *J Exp Med* 1924; 89: 77-96.

185.- RAINS A.J.H. Researches concerning the formation of gallstone. *Brit Med J* 1962; 2: 685-692.

186.- Von BUCH C.H.; HEINRICHS H.J. Beitrag zur cholelithogenesis. *Zschr*

Arztl Tortbild 1972; 66, 24: 1254-1257.

187.- JUNNIPER K Jr. Disorders of the extrahepatic biliary tract. Gastroenterologic Medicine. Ed. Lea and Fabker. Philadelphia. 1967.

188.- BUDD G. On diseases of the liver. Branchard and Lea. 2<sup>a</sup> ed. Philadelphia. 1853. 339-365.

189.- NAUNYN B. Klinik der cholelithiasis. Leipzig FCW. Vogel 1892.

190.- SARRIS H.; HAUTON J.; PLANCHE N.E. Diet, cholesterol gallstones and composition of bile. J Dig Dis 1970; 15: 251-260.

191.- TRUCDICUM J.L.W. A treatise on gallstones. London. John Churchill and sons. 1863.

192.- BOYSEN J. Galdestenenenes struktur os Pathogense Kjobenhaun. 1900.

193.- ROUSING T. Weitere beitrage zur Pathogense der gallenstreinkraukheit. Acta Chir Scand 1923; 56: 207-272.

194.- RIEGEL C.; RAUDIN I.S.; JOHNSTON C.H. Studies in gallbladder function. VI. The absorption of bile salts and cholesterol from the bile free gallbladder. Am J Physiol 1932; 99: 656-665.

195.- ANDREWS E.; SCHOENHEIMER R.; HARDINA L. Etiology of gallstones. I. Chemical factors and the role of the gallbladder. Arch Surg 1932; 25: 796-810.

196.- JOHNSTON C.H.; IRVIN J.N.; WALTON D. The free choline and phospholipid of hepatic and gallbladder bile. J Biol Chem 1939; 131: 425-437.

197.- NAUNYN B. Die gallestein. Jhre erstechung und jhre bau. Mitteilung Grenzgeb. Med Chir 1921; 33: 1-20.

198.- KAMEDA H. Gallstone disease in Japan. A report of 812 cases. Gastro-

enterology 1964; 46: 109-113.

199.- BOCKUS E.L. Anatomía y fisiología de la vesícula biliar y de las vías biliares. En: Gastroenterología. Ed. Sanders WB. Filadelfia. 1976. 3: 655-696.

200.- MOSBACH E.H.; SALEN G. Bile acid biosynthesis. Pathways and regulation. Am J Dig Dis 1974; 19: 920-929.

201.- SCHAFFER E.A.; SMALL D.M. Gallstone disease: pathogenesis and management. Curr Probl Surg 1976 (july) 13: 1-72.

202.- SAMPLINER R.E.; BEUNNETT P.H.; CONESS L.J.; ROSE F.A.; BURCH T.A. Gallbladder disease in Pima Indians. Demonstration of high prevalence and early onset by cholecystography. N Engl J Med 1970; 283: 1358-1364.

203.- BENNION L.J.; KNONLER W.C.; MOTT D.M.; SPAGNOLA A.M.; BENNETT P.H. Development of lithogenic bile during puberty in Pima Indians. N Engl J Med 1979; 300: 873-876.

204.- NEWMAN H.F.; NORTHROP J.D. Autopsy incidence of gallstones. Int Abstr Surg 1959; 109: 1-9.

205.- VAN der LINDEN W.; NAKAYAMA F. Gallstone disease in Sweden versus Japan. Clinical and etiological aspects. Am J Surg 1973; 125: 267-272.

206.- SAMPLINER R.E.; BENNETT P.H.; COMESS L.J. et al. Gallbladder disease in Pima Indians: demonstration of high prevalence and early onset by cholecystography. N Engl J Med 1970; 283: 1358-1364.

207.- CUNNINGHAM J.A.; HARDENBURG F.E. Comparative incidence of cholelithiasis in the negro and white races. Arch Intern Med 1956; 97: 68-72.

208.- VAN der LINDEN W. Some biological traits in female gallstone disease patients. Acta Chir Scand Suppl 1961; 269: 1-94.

- 209.- KERN F.Jr.; EVERSON G.T.; DEMARK B. et al. Biliary lipids, bile acids and gallbladder function in the human female: effects of contraceptive steroids. *J Lab Clin Med* 1982 (June); 99,6: 798-805.
- 210.- SCRAGG R.K.R.; McMICHAEL A.J.; SEAMARK R.F. Oral contraceptives, pregnancy and endogenous oestrogen in gallstone disease. A case control study. *Br Med Jour* 1984; 288: 1795-1799.
- 211.- HORN G. Observations on aetiology of cholelithiasis. *Br Med J* 1956; 2: 732-737.
- 212.- SASTIC J.W.; GLASSMAN C.J. Gallbladder disease in young women. *Surg Gynecol Obstet* 1982; 155: 209-211.
- 213.- CAPPON J.P.; DELAMARRE J. et al. Meal frequency and duration of overnight fast: a role in gallstone formation? *Br Med J* 1981 (Nov); 283: 1435.
- 214.- WERNER D.; EMMETT P.M.; HEATON K.W. Effects of dietary sucrose on factors influencing cholesterol gallstone formation. *Gut* 1984; 25: 269-274.
- 215.- MABEE T.; MEYER D.; DENBEWSTEN L.; MASON E. The mechanism of increased gallstone formation in obese human subjects. *Surgery* 1976; 79: 460-468.
- 216.- HASHIMOTO K. Experimental studies on gallstone formation. *Arch Jap Chir* 1965; 34: 571-586.
- 217.- NAKAYAMA F.; MIKYAKE H. Changing state of gallstone disease in Japan. Composition of the stones and treatment of the condition. *Am J Surg* 1970; 120: 794-799.
- 218.- JUTTIJUDATA P.; CHIEMCHAI SRI C.; PALAVATANA C.; CHURNRATANAKUL S. Biliary tract disease in Thailand. *Surg Gynecol Obstet* 1984 (Jan); 158: 13-16.

- 219.- JUTTIJUDATA P.; CHIEMCHASRI C.; PALAVATANA C.; CHURNRATANAKUL S. Causes of cholestasis in Thailand. A study of 276 consecutive patients. *Am J Surg* 1984; 147: 360-366.
- 220.- CHRISTENSSON T.; EINARSSON K. Cholelithiasis in subjects with hypercalcemia and primary hyperparathyroidism detected in a health screening. *Gut* 1977; 18: 543.
- 221.- SELLE J.G.; ALTEMEIER W.A.; FULLEN W.D.; GOLDSMITH R.E. Cholelithiasis in hyperparathyroidism, a neglected manifestation. *Arch Surg* 1972; 105: 369-374.
- 222.- HOLT R.W. Cholelithiasis after mitral valve replacement in teen-ager. *South Med J* 1977; 70: 1135-1141.
- 223.- MERENDINO K.A.; MANHAS D.R. Man-made gallstones: a new entity following cardiac valve replacement. *Ann Surg* 1973; 177: 694-699.
- 224.- PHILLIPS J.C.; GERALD B.E. The incidence of cholelithiasis in sickle disease. *A J R* 1971; 113: 27-33.
- 225.- CAPRON J.P. Le lithiase pigmentaire. *Med Chir Dig* 1979; 8: 199-207.
- 226.- BARBI G.; ANNONI G. Tratto talasemico e litogenicit  della bile. *Minerva Med* 1977; 68: 2997-2999.
- 227.- WOUNG Y.C. Mucous metaplasia of the hamster cheek pouch epithelium under hypervitaminosis A. *Expl Molec Path* 1975; 23: 132-143.
- 228.- MAKI T. Role of sulfated glycoprotein in gallstone formation. *Surg Gynecol Obstet* 1971; 132: 846-854.
- 229.- MAKI T. Cholelithiasis in the japanese. *Arch Surg* 1961; 82: 599-607.
- 230.- HWANG W.S. Cholelithiasis in Singapore. I. A necropsy study. *Gut* 1970; 11: 141-146.



- 231.- PRIDGEN J.E.; BRADLEY A.J.; McINNIS W.D. Primary intrahepatic gallstones. Arch Surg 1977; 112: 1037-1042.
- 232.- KAYE M.D.; KERN F. Clinical relationships of gallstones. Lancet 1971; 1: 221-228.
- 233.- KOZOLL D.D. Pathologic correlation of gallstones: a review of 1847 autopsies of patients with gallstones. Am Arch Surg 1959; 79: 541-556.
- 234.- NICHOLAS P.; RINAUDO P.A.; CONN H.O. Increased incidence of cholelithiasis in Laennec's cirrhosis. A postmortem evaluation of pathogenesis. Gastroenterology 1972; 63: 112-122.
- 235.- TROTMAN B.W.; MORRIS T.A. III; CHENEY H.M.; OSTROW J.D.; SANCHEZ H.M.; SOLOWAY R.D.; CONN H.O. Pigment gallstone composition in cirrhotic and non cirrhotic subjects. Am J Dig Dis 1978; 23: 872-877.
- 236.- VELO BELLVER J.L.; CUESTA ARRANZ R.M.; GOMEZ PAZ M.; ALCALA SANTAELLA R. Cambios que experimentan los lípidos de la bilis del cirrótico como causa de litogénesis. Hospital General 1979 (May-Jun) XIX (3): 113-127.
- 237.- LONENFELS A.B. Gallstones and the risk of cancer. Gut 1980; 21: 1090-1092.
- 238.- SIEVERS M.L. Unusual comparative frequency of gastric carcinoma pernicious anemia and peptic ulcer in Southwestern American Indians. Gastroenterology 1973; 65: 867-876.
- 239.- WILBUR B.G.; GOMEZ F.C.; TOMPKINS R.K. Canine gallbladder bile. Effects of proximal gastric vagotomy, truncal vagotomy and truncal vagotomy with pyloroplasty on volume and composition. Arch Surg 1975; 110: 792-796.
- 240.- VAZQUEZ ECHARRI J.; GONZALEZ CAJIGAL R. Cancer de vesícula biliar. Rev Esp Enf Ap Digest 1983; 64 (2): 99-104.

241.- GERMAIN M.; MARTIN E.; GREMILLET C. Porcelain gallbladder and cancer. Ann Chir 1979; 33: 77-80.

242.- WANEBO H.J.; CASTLE W.; FECHNER R.E. Is carcinoma of the gallbladder a curable lesion ? Ann Surg 1982; 195, 5: 624-631.

243.- DIEHL A.K. Gallstone size and the risk of gallbladder cancer. JAMA 1983; 4, 250 (17): 2323-2326.

244.- MEGUID M.M.; AUN F.; BRADFORD M.L. Adenomyomatosis of the gallbladder. Am J Surg 1984; 147: 260-262.

245.- RAM M.D.; MIDHA D. Adenomyomatosis of the gallbladder. Surgery 1975 (aug); 78, 2: 224-229.

246.- LEGER L.; CHICHE B.; SOPRANI A.; LOUVEL A. Papillons et tumeurs papillaires de la vésicule biliaire. J Chir (Paris) 1976; 112, 1: 3-14.

247.- GARCIA GIMENEZ R.; LEGUEY S.; MEDINA J.A. y cols. Características morfológicas de los agregados de colesterol en cálculos biliares. VIII Reunión del grupo español de Cristalografía Pura y Aplicada. Cádiz. 1981. (abril)

248.- RUIZ DE AGUIAR A.; LEGUEY JIMENEZ S.; LOPEZ DOMINGO M.I.; y cols. Microestructura de los cálculos biliares. N Arch Fac Med 1983; 41, 1: 25-28.

249.- DUVALDESTIN P.; MAHAI J.L.; METREAU J.M.; et al. Possible role of a defect in hepatic bilirubin glucuronidation in the initiation of cholesterol gallstones. Gut 1980; 21: 650-655.

250.- RUIZ DE AGUIAR A.; LEGUEY JIMENEZ S.; LOPEZ DOMINGO M.J.; y cols. Actualización de la estructura interna de cálculos biliares no pigmentarios. V Congreso Nacional de la Sociedad Española de Patología Digestiva. La Coruña. Rev Esp Enf Ap Digest 1984 (Jun) LXV, suppl. II.

251.- LOPEZ DOMINGO M.I.; GARCIA RUIZ J.P.; DE ANDRES R. y cols. Estudio de las proteínas de los cálculos biliares. II Congreso de la Federación Española de Sociedades de Biología Experimental y Reuniones Anuales de las Sociedades de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Comunicación a la FESBE. Madrid 6-9 Julio 1981.

252.- SUTOR D.J.; WOOLEY S.E. The sequential deposition of crystalline material in gallstones. Evidence for changing gallbladder bile composition during the growth of some stones. Gut 1974; 15: 130-131.

253.- RUIZ DE AGUIAR A.; LOPEZ DOMINGO M.I.; MEDINA NUÑEZ J.A. y cols. Correlaciones morfológicas entre los componentes de los cálculos biliares. XV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Interna. Lanzarote 3-5 junio. 1982.

254.- SUTOR D.J.; WOOLEY S.E. Statistical survey on the composition of gallstones in eight countries. Gut 1971; 12: 55-64.

255.- RUIZ DE AGUIAR A.; LEGUEY JIMENEZ S.; MEDINA NUÑEZ J.A. y cols. Características de palmitato de calcio en cálculos biliares. N Arch Fac Med 1983; 41, 10: 467-471.

256.- RUIZ DE AGUIAR A.; LEGUEY JIMENEZ S.; LOPEZ DOMINGO M.I. y cols. Avances en Gastroenterología. Composición y estructura de los cálculos biliares. Publicaciones Médicas GLAXO. De: Prof. M. Diaz-Rubio García. Jarpoy ED. SA. 1983; 177-183.

257.- BOGREN H.G. The polymorphs of calcium carbonate in human gallstones. Scand J Clin Lab Invest 1983; 43: 371-375.

258.- SUTOR D.J.; WOOLEY S.F. X Ray diffraction studies of the composition of gallstones for english and australian patients. Gut 1969; 10: 681-683.

259.- SUTOR D.J.; WOOLEY S.E. Gallstone of unusual composition : calcite, aragonite and vaterite. Science 1968; 159 : 1113.

- 260.- BEEN J.M.; BILLS P.M.; LEWIS D. Electron probe analysis in the study of gallstones. *Gut* 1977; 18: 836-842.
- 261.- BOLLAIN RODRIGUEZ M.H.; PUENTE DOMINGUEZ J.L.; POTEL LES-QUEREUX. Analisis de los cálculos primitivos de colédoco. *Rev Quir Esp* 1985 (Jul); 80-84.
- 262.- DIAZ MAURINO C. Reconocimiento óptico de minerales. En: iniciación práctica a la mineralogía. Ed. Alhambra SA. 1976; 4: 51-67.
- 263.- BEEN J.M.; BILLS P.M.; LEWIS D. Microstructure of gallstones. *Gastroenterology* 1979; 76: 548-555.
- 264.- BILLS P.M.; LEWIS D. A structural study of gallstones. *Gut* 1975; 16: 630-637.
- 265.- BURNETT W.; KENNARD C.H.L.; STEINER J.; GREEN M.K. et al. Elemental constituents of gallstones. *Lancet* 1976; 1: 1084.
- 266.- SUTOR D.J.; WILKIE L.I. Calcium in bile and calcium salts in gallstones. *Clin Chim Acta* 1977; 79: 119-122.
- 267.- SUTOR D.J. Calcium palmitate and alpha-palmitic acid in gallstones. *Gut* 1970; 11: 618-619.
- 268.- BOUCHIER J.A.; COOPERBAND S.R.; EL KODSI B.M. Mucous substances and viscosity of normal and pathological human bile. *Gastroenterology* 1965; 49, 4: 343-353.
- 269.- MAKI T.; MATSUSHIRO T.; SUZUKI N. Clasification of the nomenclature of pigment gallstones. *Am J Surg* 1982 (Sep); 144: 302-305.
- 270.- GRUNDY S.M.; DUANE W.C.; ADLER R.D.; ARON J.M.; METZGER A.L. Biliary lipids output in young women with cholesterol gallstones. *Metabolism* 1974; 23: 67-71.

- 271.- ARNAUD J.P.; APRAHAMIAN M.; ELOY R.; ADLOFF M. Cristallographie de la lithiase biliaire. *Méd Chir Dig* 1979; 8: 195-198.
- 272.- MOON K.L.; HRICAK H.; MARGULIS A.R. Nuclear magnetic resonance imaging characteristics of gallstones in vitro. *Radiology* 1983; 148: 753-756.
- 273.- LEVY N. et al. Cholesterol content of gallstones in Israel. *Israeli J Med Soc* 1976; 12: 1331-1332.
- 274.- SUZUKI N.; NAKAMURA Y.; SATO T. infrared absorption spectroscopy of pure pigment gallstones. *Tohoku J Exp Med* 1975; 116: 259-265.
- 275.- APRAHAMIAN M.; ARNAUD J.P.; ELOY R.; ADLOFF M. Contribution à l'étude des calculs biliaires. Analyses morphologique, radiologique et cristallographique. *J Chir* 1978; 115: 297-302.
- 276.- MATSUSHIRO T.; SUZUKI N.; SATO T.; MAKI T. Effects of diet on glucaric acid concentration in bile and the formation of calcium bilirrubinate gallstones. *Gastroenterology* 1977; 72: 630-636.
- 277.- SCHOENFIELD L.J. Medical therapy for gallstones. *Gastroenterology* 1974; 67: 725-727.
- 278.- NAGASE M.; TANIMURA H.; SETOYAMA K.; HIKASA Y. Present features of gallstones in Japan. A collective review of 2,144 cases. *Am J Surg* 1978; 135: 788-797.
- 279.- INSULL W. Jr.; OISO T.; TSUCHIYA K. Diet and nutritional status of Japanese. *Am J Clin Nutr* 1968; 21: 753-758.
- 280.- JAPANESE Gouvernement Economy Planning Board. Intern report regional section, 1968.
- 281.- DAM H.; CHRISTENSEN F. Alimentary production of gallstones in hamsters. *Acta Pth Microbiol Scand* 1952; 30: 236-242.

282.- LINDSTROM C.G. Frequency of gallstone disease in a Well-defined Swedish population. Scand J Gastroent 1977; 12: 341-346.

283.- ISPIZUA Y URIBARRI J.I. Estudio ultramicroscópico de los cálculos biliares. Correlación físico-química. Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Facultad de Medicina. Madrid. 1974.

284.- TROTMAN B.W.; MORRIS T.A.; SANCHEZ H.M.; SOLOWAY R.D.; OSTROW J.D. Pigment versus cholesterol cholelithiasis: identification and classification by infrared spectroscopy. Gastroenterology 1977; 72: 495-499.

285.- REID L.; CLAMP J.R. The biochemical and histochemical nomenclature of mucus. Br Med Bull 1978; 34, 1: 5-8.

286.- SPIRO R.G. Glicoproteins: structure, metabolism and biology. New Eng J Med 1963; 269: 566-573.

287.- COOK H.C. Mucinas tisulares humanas. Ed. Butterwoths. Londres. 1972.

288.- OEMRAWSINGH J.; ROOKEMA P.A. Composition and biological properties of mucins isolated from human submandibular gland. Arch Oral biol 1974; 19: 753-759.

289.- KOGA A. Electron microscopic observations on the mucous secretory activity of the human gallbladder epithelium. Zeilforsch Mikrosk Anat 1973; 139: 463-471.

290.- BOGART B.J. Secretory dynamics of the rat submandibular gland. J Ultraestruct Res 1975; 52: 139-155.

291.- LEE S.P.; Mc CAREY S.; LaMONT J.T. Aspirin prevention of cholesterol gallstone formation in prairie dogs. Science 1981; 211: 1429-1431.

292.- MONRY R.W. The special value of method that color both acid and vicinal hydroxyl groups in the histochemical study of mucins: with revised directions for the colloidal iron stain, the use of Alcian blue G-8-x and their

combinations with the periodic acid-Schiff reaction. Ann N Y Acad Sci 1963; 106: 402-423.

293.- SPICER S.S. Diamina methods for differentiating mucosubstances histochemically. J Histochem Cytochem 1965; 13: 211-234.

294.- ESTERLY J.R.; SPICER S.S. Mucum histochemistry of human gallbladder changes in adenocarcinoma, cystic fibrosis and cholecystitis. J Natl Cancer Ins 1968; 40: 1-17.

295.- TRAGUE R.H.; FRASER D.; CLAMP J.R. Changes in monosaccharide content of mucus glycoproteins in ulcerative colitis. Br Med J 1973; 2: 645-652.

296.- LEE S.P.; LIM T.H.; SCOTT A.J. Carbohydrate moieties of glycoproteins in human hepatic and gallbladder bile, gallbladder mucosa and gallstones. Clin Science 1979; 56: 533-538.

297.- LAITIO M.; HÄKKINEN J. intestinal-type carcinoma of gallbladder. A histochemical and immunological study. Cancer 1975; 36: 1668-1674.

298.- TERHO T.; LAITIO M. Polysaccharide in human gallbladder wall and bile. Biochim Biophys Acta 1974; 338: 135-150.

299.- MECKEL von HEMSBAUGH J.H. Mikrogeologie veger die concremente in thierischen organismus Y Billroth. Ed Reimer. Berlin. 1856.

300.- BHUSHANA RAO K.S.P.; MASSON P.L. J Biol Chem 1977; 252: 1188-1198.

301.- LEE S.P.; LaMONT J.T.; McCAREY S. Role of gallbladder mucus hypersecretion in the evolution of cholesterol gallstones. Studies in the prairie dog. J Clin Invest 1981; 67: 1712-1723.

302.- LaMONT J.T.; VANTOLA A.S. Synthesis and secretion of colonic glycoproteins: evidence for shad-duig in vivo of low molecular weight membrane components. Biochim Biophys Acta 1980; 629: 553-565.

- 303.- VON HELMSBACH M. Mikrogeologie. Berlin. Reimer. 1856.
- 304.- DE BOER W.G.R.M.; REES J.W.; NAYMAN J. Inapropriate mucin production in gallbladder metaplasia and neoplasia, an immunological study. Histopathology 1981; 15: 295-303.
- 305.- GILES R.B.; SMITH J.E.; CROWLEY G.; MICHAEL M. The study of carbohydrate in human gallbladder bile. J Lab Clin Med 1960; 55: 38-46.
- 306.- BOUCHIER I.A.D.; COOPERBAND S.R. Ten characteristic of white bile. gastroenterology 1965; 49: 354-359.
- 307.- SEDAGHAT A.; GRUNDY S.M. Cholesterol crystals and the formation of cholesterol gallstones. N Engl J Med 1980; 302: 1274-1277.
- 308.- GOLLESH S.H.; BURNSTEIN M.J.; ILSON R.G.; PETRUNKA C.N.; STRASBERG S.M. nucleation of cholesterol monohydrate crystals from hepatic and gallbladder bile of patients with cholesterol gallstones. Gut 1983; 24: 836-844.
- 309.- SUTOR D.J.; WOOLEY S.E. The organic matrix of gallstones. Gut 1974; 15: 487-491.
- 310.- GALBIATI E.; BOSCHETTI M.; NERONI R. Calcolosi coledocica iatrogena. Min Chir 1980; 35: 575-578.
- 311.- FINK D.L.; BUDD D.C. Chronic suture material as a nidus for common duct stone formation. Int Surg 1983; 68, 2: 151-152.
- 312.- GARCIA J.C.; LEMARCHAND F.; SAMANA G. Corps étrangers des voies biliaires. I . Corps étrangers postopératoires des voies biliaires. Sem Hôp Paris 1983; 59, 15: 1204-1208.
- 313.- ARZUA ZULAICA E.de; Sobre la formación de cálculos biliares. Rev Esp Enf Ap Digest 1971; XXXIII; 1: 35-38.



314.- OGATA T.; NISHIE Y. A scanning electromicroscope study on the formation of cholesterol stones. Thoku J Exp Med 1974; 113: 371-379.

315.- WHITING M.J.; Mc KWATTS J. Supersaturated bile from obese patients without gallstones supprots cholesterol crystal growth but not nucleation. Gastroenterology 1984; 86: 243-248.

316.- SMALL D.M. Cholesterol nucleation and growth in gallstones formation. N Engl J Med 1980; 302: 1305-1307.

317.- HOLZBACH R.T.; MARH M.; OLSZEWSKI H.; HOLAN K. Cholesterol solubility in bile: evidence that supersaturated is frequent in healthy man. J Clin Invest 1973; 52: 1467-1479.

318.- BOGREN H.; LARSSON K. Crystalline components of biliary calculi. Scand J Clin Lab Invest 1963; 15: 457-462.

319.- BURNSTEIN M.J.; ILSON R.G.; PETRUNKA C.N.; TAYLOR R.D.; STRASBERG S.M. Evidence for a potent nucleating factor in the gallbladder bile a patients with cholesterol gallstones. Gastroenterology 1983; 85: 801-807.

320.- CAREY M.C.; SMALL D.M. The physical chemistry of cholesterol solubility in bile. J Clin Invest 1978; 61: 988-1026.

321.- SUTOR D.J.; PERCIVAL I.M. Presence or absences of inhibitors of crystal growth in bile. Gut 1976; 17: 506-510.

322.- NAKAYAMA Y.; MARGULIS H.C.; YOKOYAMA S.; KEZDY F.J.; KAISER E.T.; COE F.L. Purification and characterization of a calcium oxalate monohydrate crystal growth inhibitor from human kidney tissue culture medium. J Biol Chem 1981; 256: 3936-3944.

323.- HOLZBACH R.T.; KIBE A.; THIEL E.; HOWELL J.H.; MARSH M.; HERMANN E. Biliary proteins. unique inhibitors of cholesterol crystal nucleation in human gallbladder bile. J Clin Invest 1984 (Jan); 73: 35-45.

- 324.- KLEEBERG J. Experimental studies on colloid chemical mechanism of gallstones formation. *Gastroenterology* 1953; 80: 313-339.
- 325.- KLEEBERG J. Further physicochemical studies in model gallstone formation; role of dehydration. *Gastroenterology* 1956; 85: 271-280.
- 326.- BENNION L.J.; GRUNDY S.M. Risk factors for the development of cholelithiasis in man. (Part 2) *N Engl J Med* 1978; 299: 1221-1227.
- 327.- LAIRON D.H.; LAFONT H.; HAUTON J.C. Lack of mixed micelles: bile salt- lecithin-cholesterol in bile and the presence of a lipoprotein complex. *Biochimie* 1972; 54: 529-530.
- 328.- MANZATO E.; FELLIN R.; BAGGIO G.; WALCH S.; NEUBECK W.; SEIDEL D. Formation of lipoprotein X. Its relationship to bile compounds. *J Clin Invest* 1975; 57: 1248-1260.
- 329.- HUTTON S.W.; SIEVERT C.E.; VENNES J.A.; DUANE W.C. The effect of sphincterotomy on gallstone formation in the prairie dog. *Gastroenterology* 1981; 81: 663-667.
- 330.- EVANS D.F.; CUSSLER E.L. Physicochemical considerations in gallstone pathogenesis. *Hospital Pract* 1974; 1: 133.
- 331.- TAXONERA SAMSO C.; GARCIA ALBARRAN J.; VILLACORTA PATIÑO J.; DIAZ-RUBIO GARCIA M. Vesícula gigante: aportación de un caso y revisión de la literatura. *Rev Esp Enf Ap Digest* 1983; 64: 2: 141-144.
- 332.- FEVERY J.; VON DAMME B.; MICHIELS R.; DE GROOTE J.; HEIRWEGH K.P.M. bilirubin conjugates in bile of man and rat in the normal state and in liver disease. *J Clin Invest* 1972; 51: 2482-2492.
- 333.- RICHARDSON M.W. On the role of bacteria in the formation of gallstones. *J Boston Soc Med Sci* 1898; 3: 79-82.
- 334.- ILLINGWORTH C.F.W. Types of gallbladder infection: study of 100 opera-

ted cases. Br J Surg 1927; 15: 221-228.

335.- RAINS A.J.H.; BARSON G.J.; CRAWFORD N. et al. A chemical and bacteriological study of gallstones. The presence of an actinomycete. Lancet 1960; 1: 614-618.

336.- SATO T. A study on bilirubin in pigmented calcium stones. Tohoku J Exp Med 1962; 77: 83-86.

337.- TERA H. The passage of calcium into the gallbladder through its wall. A study in the rabbit with the isotope  $\text{Ca}^{45}$ . Acta Chir Scand 1961; 120: 358-365.

338.- WILKIE A.L. The bacteriology of cholecystitis :clinical and experimental study. Br J Surg 1927; 15: 450-465.

339.- JUNIPER K. Jr.; WOOLF W.E. Biliary tract studies. I. X-ray diffraction analysis of gallstones: correlation with occurrence of microspherotiths in bile. Am J Med 1956; 20: 383-391.

340.- CSENDES A.; FERNANDEZ M.; URIBE P. Bacteriology of the gallbladder bile in normal subject. Am J Surg 1975; 129: 629-631.

341.- PHEMISTER D.B.; ARONSOHN H.G.; PEPINSKY R. variation in the cholesterol, bile pigment and calcium salts content of gallstones formed in the gallbladder and in the bile ducts with the degree of associated obstruction. Am Surg 1939; 109: 161-186.

342.- BILLS P.W.; LEWIS D. A structural study of gallstones. Gut 1975; 16: 630-637.

343.- RUPPIN D.; DOWLING R. ¿Es inevitable la recidiva después de la disolución de los cálculos biliares mediante tratamiento con ácidos biliares? Lancet (ed esp) 1982; 1, 1: 25-30.

344.- MIYAKE H.; HISATSUGU T. Desintegration of gallstones and urinary

calculi in man. Arch Surg 1962; 85: 104-117.

345.- FLEISCHNER G.; ARIAS J.M. Recent advances in bilirubin formation transport, metabolism and excretion. Am J Med 1970; 49: 576-589.

346.- HEPNER G.W. The effect of decreased gallbladder stimulation on enterohepatic cycling and kinetics of bile acids. Gastroenterology 1974; 67: 797-801.

347.- SUTOR D.J.; PERCIVAL J.M. The effects of bile on the crystallisation of calcium carbonate, a constituent of gallstones. Clin Chim Acta 1978; 89: 479-483.

348.- MATH M.V. Meal frequency and duration of overnight fast: a role in gallstone formation? Br Med J 1982; 284: 194-195.

349.- EL-GAILANI T.I. Gallstones and cholecystitis. Int Surg 1967; 47: 264-267.

350.- POTTER M.G. Observations of gallbladder and bile during pregnancy and term. JAMA 1936; 106: 1070-1074.

351.- NAKAYAMA F. Studies on calculus versus nutrient, gallstone and bile. J Lab Clin Med 1971; 77: 366-372.

352.- VLHACEVIC Z.R.; BELL C.C. Significance of the liver in the production of lithogenic bile in man. Gastroenterology 1970; 59: 62-69.

353.- KOWALESKI K.; TODD E.F. Carcinoma of the gallbladder induced in hamsters by insertion of cholesterol pellets and feeding dimethylnitrosamine. Proc Soc Exp Biol Med 1971; 136: 482-486.

354.- SVANIDZE J.K. Comparative histology of the gallbladder mucous membrane of vertebrates. Arxiv Anatoniis, Histologii i Embriologii 1957; 34: 74.

- 356 -

355.- LEV R.; SPICER S.S. Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. J Histochem 1964; 4: 309-314.

356.- RAMBOURG A; HERNANDEZ W.; LEBUER C.P. retention of complex carbohydrates in the Golgi apparatus of rat cells. J Cell Biol 1969; 40: 395-414.



BIBLIOTECA